

---

---

**Einfluss des Guanylatzyklasestimulators Riociguat auf  
die induzierte Herzinsuffizienz nach transverser  
Aortenkonstriktion (TAC) im Mausmodell**

---

---

**I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n**

zur

Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Greifswald

vorgelegt von

Alexander Benkner

Greifswald, 26.10.2021

Dekan: Prof. Dr. Gerald Kerth

1. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Völker

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Tobias Brüggemann

Tag der Promotion: 11.05.2022



*Meiner Mutter*



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
Abkürzungsverzeichnis.....	iv
Zusammenfassung.....	vi
1. Einleitung.....	1
1.1 Chronische Herzinsuffizienz.....	1
1.2 NO-sGC-cGMP Signaling.....	6
1.3 Cardiomics: integrative kardiovaskuläre Analysen auf Transkriptom- und Proteomebene ...	13
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	19
2. Material.....	21
2.1 Chemikalien und Substanzen.....	21
2.2 Verbrauchsmittel.....	22
2.3 Versuchstiere.....	24
2.4 Enzyme, Kits und Standards.....	24
2.5 Antikörper.....	25
2.6 Geräte.....	25
2.7 Software.....	27
3. Methoden.....	29
3.1 Tierexperimentelle Arbeiten.....	29
3.1.1 Transverse Aortenkonstriktion (TAC) in der Maus.....	29
3.1.2 Medikamentöse Behandlung.....	30
3.1.3 Kleintierechokardiographie.....	31
3.1.4 Versuchsaufbau und Studiendesign.....	32
3.1.5 Euthanasie und Organentnahme.....	33
3.2 Histologische Analysen.....	34
3.2.1 Piko-Siriusrot-Färbung.....	34
3.2.2 Dystrophin-Immunfärbung.....	34
3.2.3 Mikroskopie.....	35
3.3 Proteinbiochemische Analysen.....	36
3.3.1 Proteinextraktion aus Herzgewebe.....	36
3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	37
3.3.3 Probenaufbereitung für massenspektrometrische Analysen.....	37
3.3.4 Proteomanalyse mittels LC-ESI MS/MS.....	39

---

3.3.5 Datenauswertung.....	40
3.3.6 Funktionelle Klassifizierung .....	42
3.3.7 Eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1D-PAGE).....	42
3.3.8 Western Blot und Detektion .....	44
3.4 RNA- und microRNA-Sequenzierung.....	46
3.4.1 RNA-Extraktion aus Herzgewebe .....	47
3.4.2 Probenvorbereitung und Sequenzierung .....	47
3.4.3 Datenauswertung.....	48
3.4.4 Funktionelle Klassifizierung .....	50
3.4.5 Validierung der RNA-Seq Ergebnisse.....	52
4. Ergebnisse.....	55
4.1 Modellcharakterisierung nach transverser Aortenkonstriktion (TAC) und Phänotypisierung nach Behandlung mit Riociguat.....	55
4.1.1 Erhebung der kardialen Funktionsparameter.....	55
4.1.2 Charakterisierung der Hypertrophie.....	59
4.1.3 Charakterisierung der kardialen Fibrosierung.....	60
4.2 Einfluss der Riociguat-Behandlung auf das murine linksventrikuläre Transkriptom nach TAC .....	61
4.2.1 Relative Quantifizierung der Unterschiede im Transkriptom herzinsuffizienter Mäuse mit und ohne Riociguatmedikation .....	61
4.2.2 Funktionelle Klassifizierung differentiell exprimierter Gene.....	65
4.2.3 Validierung der Expressionsdaten mittels NanoString's nCounter® Plattform.....	71
4.3 Einfluss der Riociguat-Behandlung auf das murine linksventrikuläre Proteom nach TAC.....	73
4.3.1 Relative Quantifizierung der Unterschiede im Proteom herzinsuffizienter Mäuse mit und ohne Riociguatmedikation .....	73
4.3.2 Funktionelle Klassifizierung der veränderten Proteine.....	79
4.3.3 Analyse und Validierung der Proteomdaten mittels Western Blot.....	87
4.4 Vergleichende Analyse der RNA-Seq und Proteomdaten .....	91
4.4.1 Generelle quantitative Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen Transkriptom- und Proteommustern herzinsuffizienter Mäuse mit und ohne Riociguatmedikation.....	91
4.4.2 Molekulare Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen Transkriptom und Proteom herzinsuffizienter Mäuse mit und ohne Riociguatmedikation auf funktioneller Ebene.....	94

---

4.5 Einfluss der Riociguat-Behandlung auf das murine linksventrikuläre microRNA-Expressionsprofil nach TAC.....	98
4.5.1 Relative Quantifizierung der Unterschiede im Expressionsmuster herzinsuffizienter Mäuse mit und ohne Riociguatmedikation .....	98
4.5.2 Funktionelle Klassifizierung differentiell exprimierter microRNAs.....	106
4.5.3 Vergleichende funktionelle Analyse von microRNA- und Transkriptomdaten.....	108
4.5.4 Vergleichende funktionelle Analyse von microRNA- und Proteomdaten .....	119
5. Diskussion.....	123
5.1 Auswirkungen einer Riociguat-Behandlung auf die Herzfunktion und pathologisches kardiales Remodeling nach TAC.....	124
5.2 Auswirkungen einer Riociguat-Behandlung auf linksventrikuläre molekulare Veränderungen nach TAC.....	127
5.3 Rolle der microRNA bei kardialem Remodeling nach TAC und unter RIO-Behandlung .....	136
5.4 Schlussfolgerungen, Limitationen und Ausblick.....	142
6. Literaturverzeichnis.....	147
7. Anhang .....	175
Eigenständigkeitserklärung .....	179
Publikationen und Kongressbeiträge.....	181
Danksagung .....	185

# Abkürzungsverzeichnis

ABC	Ammoniumbicarbonat
ACCF	<i>American College of Cardiology Foundation</i>
ACN	Acetonitril
A. dest.	<i>aqua destillata</i> (einfach destilliertes Wasser)
ad.	<i>addere</i> (auffüllen auf)
AHA	<i>American Heart Association</i>
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat ( <i>cyclic guanosine monophosphate</i> )
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation
CTEPH	chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie
CVD	kardiovaskuläre Erkrankung ( <i>cardiovascular disease</i> )
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DEG	differentiell exprimiertes Gen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ESI MS/MS	Elektrosprayionisation Tandem-Massenspektrometrie
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
HCl	Salzsäure
HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
HI	Herzinsuffizienz
HPLC	hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
i.D.	innerer Durchmesser
i.p.	intraperitoneal
IAA	Iodacetamid
ID	Identifizierungszeichen ( <i>identifier</i> )
IHC	Immunhistochemie
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
KCl	Kaliumchlorid
LC-ESI MS/MS	Flüssigkeitschromatographie gekoppelt an ESI-MS/MS
LFQ	<i>Label-Free Quantification</i>
LM	Lösungsmittel
LTQ	<i>Linear Trap Quadrupole</i>
LV	Linker Ventrikel, linksventrikulär
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVFS	Linksventrikuläre Verkürzungsfraktion
LVM/BW	Linksventrikuläre Masse zu Körpergewicht
LysC	Endoproteinase aus <i>Lysobacter enzymogenes</i>

---

m/z	Masse-zu-Ladung Verhältnis
mAb	<i>monoclonal Antibody</i>
miR	reife ( <i>mature</i> ) microRNA
miRNA	microRNA
miRNA-Seq	microRNA-Sequenzierung
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrometer
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>Next-Generation-Sequencing</i>
NO	Stickstoffmonoxid ( <i>nitric oxide</i> )
nt	Nukleotid
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
o.g.	oben genannt
pAb	<i>polyclonal Antibody</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAH	pulmonal arterielle Hypertonie
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCA	Hauptkomponentenanalyse
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PH	pulmonale Hypertonie
RIO	Riociguat
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
RNOS	reaktive Stickstoff-/Sauerstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sGC	lösliche Guanylatzyklase ( <i>soluble guanylate cyclase</i> )
Sham	Bezeichnung für scheinoperierte Tiere
sog.	sogenannt
TAC	Transverse Aortenkonstriktion ( <i>transverse aortic constriction</i> )
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
UPLC	ultrahochauflösende Flüssigkeitschromatographie
UT	Urea/Thiourea
vs.	<i>versus</i> (gegenüber, im Vergleich zu)
WB	Western Blot
z.B.	zum Beispiel

# Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören trotz zahlreicher medikamentöser und apparativer Therapiemaßnahmen noch immer zu den häufigsten Todesursachen in den Industrienationen. Die Herzinsuffizienz (HI) stellt dabei das Endstadium vieler Herzerkrankungen dar und beschreibt das Unvermögen des Herzens, die Blutzirkulation im Organismus bei normalem Ventrikeldruck konstant zu halten. Unabhängig von ihrer Ätiologie, wie Koronarerkrankungen, langjähriger Hypertonie oder auch Kardiomyopathien ist die HI neben der Funktionsreduktion des linken und/oder rechten Ventrikels gleichzeitig durch strukturelle Veränderungen (Remodeling) mit Gefäßverengung (Vasokonstriktion), endotheliale Dysfunktion mit Vasokonstriktion, sowie eine generalisierte neurohumorale Aktivierung gekennzeichnet. Die Suche nach neuen und alternativen Therapieverfahren zur Verbesserung der Symptomatik und Prognose der betroffenen Patienten ist daher notwendig. Einer der wichtigsten Mediatoren für die Regulation des Gefäßwiderstandes ist Stickstoffmonoxid (NO, *nitric oxide*), welches durch NO-Synthasen synthetisiert wird. NO aktiviert die lösliche Guanylatzyklase (sGC, *soluble guanylate cyclase*), wodurch es zu einer erhöhten Produktion des *second messengers* cGMP (*cyclic guanosine monophosphate*) kommt. Eine Beeinträchtigung des NO-sGC-cGMP-Signalweges und der dadurch bedingte Mangel an cGMP trägt zu den Prozessen der myokardialen und endothelialen Dysfunktion bei der Entwicklung und Progression einer HI bei. Die Entwicklung pharmakologisch aktiver Moleküle, die die sGC direkt stimulieren können, ist dabei von besonderem Interesse, da z.B. keine Toleranzentwicklung bei längerer Medikation oder andere negative Nebenwirkungen wie bei der Gabe von NO-Donatoren als Vasodilatoren entstehen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss einer sGC-Stimulation mittels Riociguat (RIO), einem bereits für die Behandlung der pulmonal arteriellen Hypertonie (PAH) und der chronisch thromboembolischen pulmonalen Hypertonie (CTEPH) zugelassenen Medikament, auf die experimentelle HI untersucht werden. Neben Echokardiographie und histologischen Analysen zur Charakterisierung des Krankheitsphänotyps und der Auswirkung einer Behandlung darauf wurde ebenfalls auf Multi-Omics-Ansätze wie *Proteomics* und *Transcriptomics* zurückgegriffen, um detaillierte Einblicke in die molekularen Veränderungen auf Genexpressionsebene, Proteinebene und microRNA-Expressionsebene zu erlangen. Als Modell wurde die transverse Aortenkonstriktion (TAC) an C57BL/6N Mäusen verwendet, welche einen permanenten hämodynamischen Stressreiz auf das Herz ausübt, der schließlich zum Herzversagen führt. Im Hinblick auf die Pathogenese der HI simuliert TAC dabei auf elegante Weise eine arterielle Hypertonie, die unter anderem zu einer



progressiven linksventrikulären Hypertrophie und einer reduzierten Herzfunktion unter chronischen Bedingungen führt. Für die medikamentöse Behandlung mit RIO wurde eine experimentelle Strategie gewählt, die der klinischen Situation entspricht. Dementsprechend wurde mit der Medikation zu einem Zeitpunkt begonnen, als die Herzfunktion bereits verschlechtert war und eine pathologische Hypertrophie und interstitielle Fibrose ausgebildet bzw. nachweisbar war.

TAC führte zu einer kontinuierlichen Abnahme der linksventrikulären Ejektionsfraktionsfraktion (LVEF) und einer kontinuierlichen Zunahme der linksventrikulären Masse (LVM). Eine fünfwöchige Behandlung mit RIO (3 mg/kg/d) ab der vierten postoperativen Woche führte zu einer Verbesserung der LVEF und zu einer Verringerung des Verhältnisses von LVM zu Gesamtkörpergewicht (LVM/BW), myokardialer Fibrose und Myozytenquerschnittsflächen. RNA-Sequenzierungsanalysen der linken Ventrikel ergaben, dass RIO die Expression von myokardialen Stress- und Remodeling-Genen, wie z.B. *Nppa*, *Nppb*, *Myh7* und Kollagen, verringerte und die Aktivierung biologischer Signalwege abschwächte, die mit kardialer Hypertrophie und HI in Verbindung stehen. Diese protektiven Effekte einer RIO-Behandlung konnten auch auf Proteinebene beobachtet werden und spiegelten sich in einer deutlichen Reduktion der TAC-induzierten Veränderungen des linksventrikulären Proteoms wider. Durch die Aortenkonstriktion betroffene Signalwege, die mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert sind, wie gewebe- und zellstrukturspezifische Signalwege, besonders aber Signalwege des Energiemetabolismus, zeigten eine Verbesserung nach einer RIO-Behandlung. Zudem schwächte RIO auch die TAC-induzierten Veränderungen auf microRNA-Ebene in den linken Ventrikeln ab.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit RIO positive Auswirkungen auf die kardiale Struktur bzw. das pathologische kardiale Remodeling und die Funktion in einem murinen Modell der chronischen Nachlasterhöhung/Drucküberlastung hat, was mit einer Umkehrung bzw. Abschwächung der TAC-induzierten Veränderungen des kardialen linksventrikulären Genexpressions-, Proteom- und microRNA-Profiles einhergeht. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die bisherigen Vermutungen und Erkenntnisse zum Potential von RIO als neuartigem HI-Therapeutikum. Des Weiteren wurden große Omics-Datensätze generiert, die als Informationsquelle zukünftigen Untersuchungen helfen können, die molekularen Mechanismen der chronischen HI und möglicher therapeutischer, medikamentöser Interventionen besser zu verstehen und weiter zu entschlüsseln.



# 1. Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind noch immer die Haupttodesursache in der westlichen Welt, wobei diese allein in Deutschland in 2019 für mehr als ein Drittel aller Sterbefälle verantwortlich waren. Nach chronischer ischämischer Herzkrankheit und akutem Myokardinfarkt bildet die Herzinsuffizienz (HI) hier die dritthäufigste der Herz-Kreislaufkrankungen mit Todesfolge (Statistisches Bundesamt, Stand 30. November 2020). Die HI stellt dabei eine der Hauptindikationen für Krankenhausaufenthalte in Europa und den Vereinigten Staaten dar, wobei die Prävalenz aufgrund der alternden Bevölkerung und der Verlängerung der Lebenserwartung stetig zunimmt [1, 2]. In den letzten Jahrzehnten hat die Behandlung der HI zwar die Überlebenschancen verbessert und die Zahl der Hospitalisierungen reduziert, allerdings bleiben die Therapieergebnisse nach wie vor unzureichend, sodass die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden weiterhin notwendig ist [2, 3].

## 1.1 Chronische Herzinsuffizienz

Bei der chronischen Herzinsuffizienz handelt es sich um eine Erkrankung, die durch ein ausgeprägtes Wechselspiel zwischen Herzfunktion, Kreislauf, Nierenfunktion und zentralhormonellen Veränderungen gekennzeichnet ist und sich über einen längeren Zeitraum ausprägt. Sie beschreibt das Unvermögen des Herzens, die vom Körper benötigte Blutmenge zur Versorgung des Gewebestoffwechsels in Ruhe und bei Belastung zu fördern und geht mit Symptomen wie Dyspnoe (Atemnot), Fatigue (Erschöpfung, Müdigkeit) sowie peripheren und/oder pulmonalen Ödemen (Schwellungen durch Wassereinlagerungen) einher [2, 4-6]. Die HI bezeichnet ein komplexes heterogenes, klinisches Syndrom, also einen Symptomenkomplex, und stellt somit das Endstadium vieler Herzerkrankungen dar [7].

Der Schweregrad der Symptome wird in der Regel nach den funktionellen Klassifizierungen der NYHA (*New York Heart Association*) und der ACCF/AHA (*American College of Cardiology Foundation/American Heart Association*) eingestuft, die sich als die zwei am häufigsten verwendeten Klassifizierungssysteme etabliert haben. Das NYHA-System stützt sich dabei auf die Symptomatik und körperliche Leistungsfähigkeit, um Patienten anhand einer einfachen Anamnese von Stufe I (keine Beschwerden) bis IV (Beschwerden bereits in Ruhe) zu klassifizieren. Im Gegensatz dazu legt das ACCF/AHA-System den Schwerpunkt auf die Stadieneinteilung und die Entwicklung der Krankheit, um die Notwendigkeit einer HI-Prävention aufzuzeigen (Tab. 1.1) [2].

**Tabelle 1.1: Klassifizierung des Schweregrades der Herzinsuffizienz nach NYHA und ACCF/AHA.** Einteilung der Stadien der Herzinsuffizienz (HI) nach den aktuellen Leitlinien der *New York Heart Association* (NYHA) und der *American College of Cardiology Foundation* (ACCF)/*American Heart Association* (AHA). (adaptiert nach Ponikowski et al. [2])

NYHA-Klassifikation		ACCF/AHA-Klassifikation	
<b>I</b>	Keine körperliche Leistungseinschränkung durch alltägliche körperliche Aktivität bei bestehender Herzerkrankung.	<b>A</b>	Hohes Risiko für HI, aber ohne strukturelle Herzerkrankung oder Symptome einer HI.
<b>II</b>	Leichte Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit durch alltägliche körperliche Aktivität. Beschwerdefreiheit in Ruhe.	<b>B</b>	Strukturelle Herzerkrankung, aber ohne Anzeichen oder Symptome einer HI
<b>III</b>	Deutliche Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Beschwerden bereits bei geringer körperlicher Aktivität. Beschwerdefreiheit in Ruhe.	<b>C</b>	Strukturelle Herzerkrankung mit früheren oder aktuellen Symptomen einer HI.
<b>IV</b>	Starke Beschwerden bei allen körperliche Aktivitäten und auch in Ruhe.	<b>D</b>	Refraktäre HI, die spezielle Interventionen erfordert

### *Ätiologie, Klassifizierung und Entwicklung der HI*

Die häufigste Ursache der HI ist eine ischämische Herzerkrankung, die auf eine gestörte Herzmuskeldurchblutung zurückzuführen ist, und meist durch eine akute oder chronische Myokardischämie bzw. eine Infarzierung des Herzmuskels verursacht wird. Andere häufige Ursachen sind Kardiomyopathien, langjährige Hypertonie oder Herzklappenerkrankungen. Jedoch gibt es kein einheitliches System zur ätiologischen Klassifizierung der HI. Sie kann in viele Unterkategorien nach pathophysiologischen oder funktionellen Gesichtspunkten unterteilt werden, so z.B. nach dem betroffenen Kreislaufsystem (rechts-links), der Herzfunktion (systolisch-diastolisch) oder dem zugrundeliegenden pathophysiologischen Auslöser (druckinduziert/volumeninduziert), wobei sich die möglichen Kategorien stark überschneiden [2, 7].

Die HI ist unabhängig von ihrer Ätiologie durch die Funktionseinschränkung des linken und/oder rechten Ventrikels gekennzeichnet. Während ihrer Entwicklung wird ein komplexes Netzwerk von Kompensationsmechanismen auf makro- und mikrostruktureller, zellulärer und molekularer Ebene aktiviert, um die Herzfunktion aufrechtzuerhalten. Zu den wichtigsten Aspekten dieses Netzwerkes gehören die dehnungsinduzierte Erhöhung der kardialen Vorlast durch den Frank-Starling-

Mechanismus, die Aktivierung verschiedener neurohormonaler Signalwege und strukturelle Veränderungen in der Myokardarchitektur [8-10].

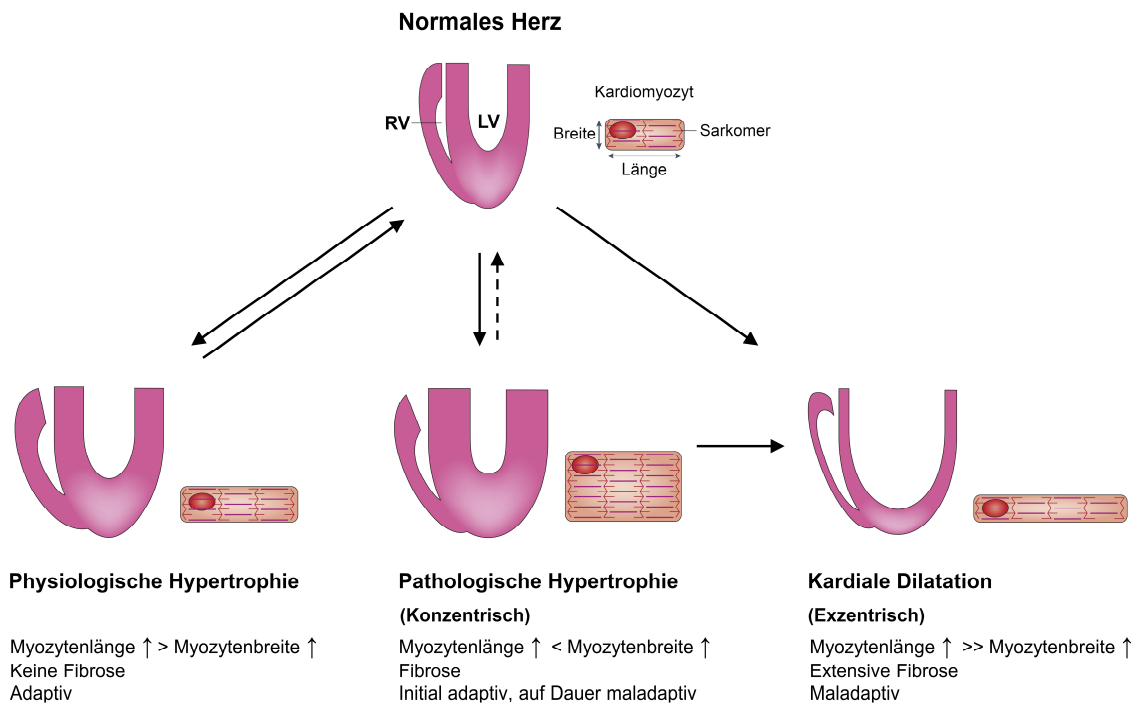
Das erste und schnellste adaptive kardiale System, das als Reaktion auf eine gestörte Herzfunktion aktiviert wird, ist das neurohumorale System, zu dem das sympathische Nervensystem, das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und vasoaktive Peptide gehören [11]. Bei der HI werden sogenannte Barorezeptoren (drucksensitive Mechanorezeptoren) im *Sinus carotis*, im Aortenbogen und im linken Ventrikel aktiviert [12]. Die weitergeleiteten Signale verändern die zentralen kardioregulatorischen Zentren, um das zirkulierende Blutvolumen und den Blutdruck zu erhöhen. Sympathische und humorale Mechanismen werden stimuliert, und das antidiuretische Hormon Vasopressin wird freigesetzt [13]. Die sympathische Aktivierung peripherer Organe, wie der Niere, der Gefäße, der Skelettmuskeln oder des Herzens selbst, führt zu einer Umverteilung der Perfusion. Diese generalisierte neurohormonale Aktivierung geht mit der Ausschüttung von Angiotensin II, Aldosteron, Katecholaminen und anderen vasoaktiven Substanzen, wie Endothelin und zuvor erwähntes Vasopressin, einher. Die Ausschüttung von Katecholaminen führt durch Stimulation kardialer  $\beta_1$ -Rezeptoren zu einer Steigerung der Myokardkontraktilität (positive Inotropie) und der Schlagfrequenz (positive Chronotropie). Durch die Stimulation alpha-adrenerger Rezeptoren der Gefäße induzieren Katecholamine eine venöse und arterielle Vasokonstriktion und konsekutiv eine Vor- und Nachlasterrhöhung, um die Durchblutung der lebenswichtigen Organe Herz und Hirn aufrechtzuerhalten [10, 11, 13]. Die durch die Vasokonstriktion verursachte Zunahme des systemvaskulären Widerstandes wird durch Vasopressin, Angiotensin II und Aldosteron verstärkt. Zusätzlich vermitteln Aldosteron und Vasopressin in der Niere eine Flüssigkeitsretention. Insbesondere die Flüssigkeitsretention und die Nachlasterrhöhung führen zu einer weiteren Belastung des linken und rechten Ventrikels mit der Folge einer Abnahme der kardialen Pumpfunktion. Dies wiederum führt zu einer weiteren Zunahme der Aktivierung des neurohumoralen Systems. Während die neurohumorale Aktivierung initial einen sinnvollen physiologischen, hämodynamischen Kompensationsmechanismus darstellt, führt sie im weiteren Verlauf zu einer Myokardschädigung und der Verschlechterung der kardialen Funktion. Die Folge ist ein Circulus vitiosus, der unbehandelt oftmals in einer dekompensierten HI und schließlich im terminalen Herzversagen endet. Darüber hinaus führt die ständige neurohumorale Aktivierung zu transkriptionalen und post-transkriptionalen Veränderungen der Genexpression, insbesondere bei Genen, welche die Struktur und Mechanik der Kardiomyozyten regulieren. Auch diese zunächst physiologisch sinnvollen Kompensationsmechanismen führen jedoch langfristig zu einer Schädigung des Myokards und zur Progression der Erkrankung [10].

Die meisten der o.g. ursächlichen Krankheitsstimuli führen zuerst zu einer Phase der kardialen Hypertrophie, während derer Myozyten in Länge und/oder Breite wachsen, um die Pumpleistung des Herzens zu erhöhen und die Spannung der Ventrikelwände zu verringern, und hat schließlich die Vergrößerung und Verdickung des Herzmuskels zur Folge [14, 15]. So lange die Pumpfunktion aufrechterhalten werden kann, spricht man von kompensatorischer Hypertrophie. Bleibt die Belastung jedoch bestehen, kann diese kompensatorische Form in eine dekompensierte HI mit Dilatation und stark eingeschränkter Herzfunktion übergehen [16]. Diese funktionellen, strukturellen und molekularen Veränderungen des Myokards während der Progression der HI werden zusammengefasst als kardiales Remodeling bezeichnet [17].

### *Kardiales Remodeling*

Unter kardialem Remodeling werden Veränderungen der Größe, Masse und Form des Herzens (Hypertrophie) als Reaktion auf ein bestimmtes kardiales Ereignis zusammengefasst, um die ventrikuläre Wandspannung zu verringern und einer erhöhten Arbeitslast entgegenzuwirken. Unterschieden wird das Remodeling in physiologische/pathologische bzw. adaptive/maladaptive Hypertrophie (Abb. 1.1). Physiologische Hypertrophie kann während der Schwangerschaft und beim Ausdauertraining auftreten und zeichnet sich vor allem durch eine leichte Zunahme (10-20%) des Herzkammervolumens mit einer koordinierten Zunahme der Wanddicke und individuellem Kardiomyozytenwachstum in Länge und Breite aus [18-20].

Pathologische Hypertrophie tritt hingegen nach pathologischen Stimuli, wie z.B. einer Herzschädigung durch einen Myokardinfarkt, Myokarditis, Druck- oder Volumenüberlastung auf und bezeichnet den Übergang von einem Kompensationsprozess zu einer maladaptiven Fehlanpassung. Verschiedene Stimuli lösen dabei unterschiedliche Formen der Hypertrophie aus. So führt Drucküberlastung zu einer Verdickung der Ventrikelwände bei Verringerung des Kammervolumens durch verstärkte Parallelanordnung von vermehrt synthetisierten Sarkomeren auf zellulärer Ebene. Die Kardiomyozyten wachsen stärker in der Breite im Vergleich zur Länge, was letztlich in konzentrischer Hypertrophie resultiert. Eine Volumenüberlastung hingegen bewirkt eine exzentrische Hypertrophie und fortschreitende Ventrikeldilatation. Die Kardiomyozyten wachsen verstärkt in die Länge, da sich die Sarkomere in Reihe anordnen, und es erhöht sich sowohl die kardiale Masse als auch das Kammervolumen [19].



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung kardialer Hypertrophie.** Hypertrophie wird über Ventrikelwachstum und Kardiomyozytenwachstum definiert. LV: linker Ventrikel, RV: rechter Ventrikel. (adaptiert nach Heineke & Molkentin [18], Maillet et al. [20])

Unabhängig von der zugrundeliegenden pathologischen Ursache erfolgt kardiales Remodeling über gemeinsame mechanische, molekulare und biochemische Mechanismen und Signalwege, die alle Zellen und Komponenten des gesamten Herzens, wie Kardiomyozyten, Fibroblasten, das Endothel und das Interstitium, umfassen [21]. Neben der Myozytenhypertrophie wird das Remodeling von einer Vielzahl zellulärer Veränderungen wie Myozytenverlust durch Apoptose [22, 23] oder Nekrose [24, 25], Fibroblastenproliferation [26], Akkumulation proinflammatorischer Mediatoren [27] und Reorganisation der extrazellulären Matrix (ECM) [28], die durch die Induktion von Fibrose gekennzeichnet ist [29], begleitet. Vor allem führt die Fibrose zu einer weiteren Verschlechterung der systolischen Funktion und zu einer Versteifung des Herzmuskels mit Ausbildung einer diastolischen Funktionsstörung. Des Weiteren ist der Übergang zu einer maladaptiven Dekompensation durch eine Dysregulation der Proteine des  $\text{Ca}^{2+}$ -Handlings [30], mitochondriale Dysfunktion [31], metabolische Reprogrammierung [32], Reaktivierung der fetalen Genexpression [33], gestörte Protein- und mitochondriale Qualitätskontrolle [34], und unzureichende Angiogenese [35] gekennzeichnet.

#### *Tiermodelle in der kardiovaskulären Forschung*

Für die Erforschung der Pathomechanismen kardialer Erkrankungen sind murine Modelle weitverbreitet. Dabei hat sich in den letzten Jahren der Schwerpunkt von der Ratte als

Hauptmodellorganismus weitgehend auf die Maus verschoben [18]. Auch wenn sich die Physiologie und Pathophysiologie von humanen und murinen Herzen unterscheiden, so stellen Mausmodelle, die menschliche Erkrankungen nachahmen, wichtige Hilfsmittel für die Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen dar [36]. Neben verschiedenen, mittlerweile gut charakterisierten Modellen basierend auf genetischen Manipulationen wie *knout-out* und transgenen Überexpressionsmodellen, oder auch chemischen bzw. pharmakologischen Interventionen, wie die Verabreichung von Isoproterenol oder Angiotensin-II, gibt es gut etablierte und oft verwendete Modelle, die auf chirurgischen Interventionen beruhen, um eine HI zu induzieren [37]. So gibt es verschiedene Modelle der Nachlast-induzierten Insuffizienz des linken Ventrikels durch TAC (*transverse aortic constriction*) oder des rechten Ventrikels durch PAB (*pulmonary artery banding*), aber auch verschiedene Techniken der ischämischen HI durch Induktion einer myokardialen Ischämie bzw. eines Infarktes z.B. durch das Verschließen oder Abbinden von Koronararterien [37]. Der größte Vorteil des TAC-Modells, welches auch in dieser Arbeit Anwendung fand, besteht darin, dass diese Methode relativ einfach, kostengünstig und schnell durchzuführen ist [37].

Eine ausführliche Beschreibung dieses Verfahrens wurde von deAlmeida et al. veröffentlicht [38]. Dabei wird die Aorta auf Höhe des Aortenbogens auf einen definierten Durchmesser durch eine Ligatur verengt. Der linke Ventrikel muss dadurch gegen einen erhöhten Gefäßwiderstand arbeiten, der auf Dauer zu einer chronischen Drucküberlastung und einem anschließenden pathologischen linksventrikulären Remodeling bis hin zur Herzinsuffizienz führt [38]. Pharmakologische oder genetische Manipulationen ausgewählter Signalwege können dann durchgeführt werden, um ihre direkten Auswirkungen auf den linken Ventrikel zu untersuchen. Die Komplexität kardiovaskulärer Erkrankungen, und vor allem der HI, kann mit *in vitro* Zellmodellen nicht vollständig abgebildet werden und macht die Verwendung von Tiermodellen auch heutzutage immer noch notwendig [37].

## 1.2 NO-sGC-cGMP Signaling

Bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz ist der Signalweg von Stickstoffmonoxid (NO), löslicher Guanylatzyklase (sGC) und cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) von besonderer Bedeutung. Unter physiologischen Bedingungen ist dieser Signalweg ein wichtiger Regulator für den Energiehaushalt des Herzens, die Herzleistung und die Endothelfunktion [39-41]. Unter anderem führt eine verstärkte vaskuläre Dysfunktion zu einer verringerten Bioverfügbarkeit von NO und damit zu einem Rückgang der nachgeschalteten cGMP-Synthese [40]. Dieser cGMP-Mangel verursacht



systemische, koronare und renale Mikrozirkulationsstörungen, die zu einer fortschreitenden Myokardschädigung führen können [41-43]. In den letzten zwei Jahrzehnten wurden einerseits wichtige Erkenntnisse darüber gewonnen, dass die cGMP-Signalübertragung bei der HI gestört ist, und dass andererseits cGMP den biologischen Störungen, die zur HI beitragen, generell entgegenwirkt. Diese Erkenntnisse haben die Gestaltung und Weiterentwicklung klinischer und präklinischer Studien zu cGMP-steigernden Medikamenten bei der HI beeinflusst [44]. Im nachfolgenden Kapitel sollen daher die verschiedenen Hauptakteure dieser Signalkaskade und deren Rolle darin näher und detaillierter beschrieben werden und jeweils kurz mögliche therapeutische Ansatzpunkte im Hinblick auf kardiovaskuläre Erkrankungen und die chronische HI adressiert werden.

### *Stickstoffmonoxid (NO)*

Stickstoffmonoxid (*Nitric Oxide*, NO) wurde erstmals 1980 von Furchgott et al. als relativ instabiler Faktor identifiziert, der von Endothelzellen freigesetzt wird und aufgrund seiner gefäßerweiternden Wirkung (Vasodilatation) als *Endothelial Derived Relaxant Factor* (EDRF) bezeichnet wurde [45]. Einige Jahre später konnten sowohl Palmer als auch Ignarro und Mitarbeiter die Vermutung von Furchgott bestätigen, dass es sich bei EDRF um NO handelt [46, 47]. NO stellt dabei einen der wichtigsten Mediatoren für die Regulation des Gefäßwiderstandes dar, ist aber auch an der Regulation einer Vielzahl anderer physiologischer Prozesse beteiligt, wie z.B. der Proliferation der glatten Muskulatur oder Hemmung der Thrombozytenaggregation, und besitzt sowohl eine pro- als auch eine anti-apoptotische und anti-inflammatorische Wirkung [48, 49].

Die Bildung von NO aus der Aminosäure L-Arginin wird durch verschiedene NO-Synthasen (NOS) katalysiert. Insgesamt gibt es drei verschiedene NOS-Isoformen, die auch alle im Herzen präsent sind: die neuronale NOS (nNOS, NOS1), die endotheliale NOS (eNOS, NOS3) und die induzierbare NOS (iNOS, NOS2). Während NOS1 und NOS3 konstitutiv vorhandene Enzyme darstellen, so ist NOS2 im gesunden Herzen nicht vorhanden. Dessen Expression wird bei Inflammation während der Immunantwort durch eine Zytokin-induzierte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren vermittelt [50]. Synthetisiertes NO diffundiert durch die Zellmembranen in die Zielzellen und wirkt als parakrines und autokrines Signalmolekül [51]. Es stimuliert die Aktivität der löslichen Guanylatzyklase (sGC), was zu einer Akkumulation von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) führt. Daneben kann es auch zur S-Nitrosylierung von Tyrosin und Thiol-Gruppen von Cysteinen und somit zur Modifikation von intrazellulären Proteinen führen [50].

Bei einer Vielzahl kardiovaskulärer Erkrankungen, wie auch bei der HI, ist die Bioverfügbarkeit bzw. die Bioaktivität von NO verringert und trägt zu pathologischem kardialem Remodeling und Dysfunktion bei, wie zahlreiche experimentelle und klinische Arbeiten bisher zeigen konnten [44]. Eine gestörte NO-Produktion, verstärkte NO-Degradation oder chemische Wechselwirkungen mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) unter oxidativem Stress führen dabei zu verringerten NO-Leveln, was letztendlich die sGC-cGMP Signalübertragung stört [42].

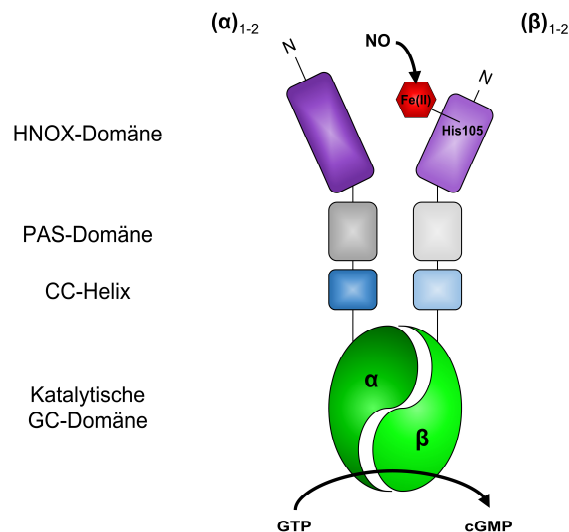
Lange Zeit bestand daher die Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen mit gestörter NO-Signaltransduktion in einer Behandlung mit NO-Donatoren, wie z.B. organischen Nitraten (Nitroglycerin, Isosorbidmononitrat/-dinitrat), Nitroprussid-Natrium, oder Molsidomin [52]. Hauptsächlich werden NO-Donatoren heutzutage zur Behandlung oder Vorbeugung von akuten Angina pectoris Attacken bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit, hypertensiven Krisen und anderen akuten Nottfällen eingesetzt, die eine schnelle Entspannung der glatten Gefäßmuskulzellen (SMC) erfordern. Eine chronische Applikation von NO-Donatoren bringt jedoch wesentliche Nachteile mit sich. So kann sich zum einen innerhalb kurzer Zeit eine Resistenz der Effektormoleküle entwickeln, zum anderen kommt es unter oxidativem Stress in Anwesenheit von Superoxid zur Bildung von Peroxinitrit, das als reaktive Stickstoff- bzw. Sauerstoffspezies (RNOS, ROS) zytotoxische Prozesse wie z.B. Apoptose induziert [53-55]. Da die positiven Effekte von NO hauptsächlich durch die sGC-cGMP abhängigen *downstream* Mechanismen vermittelt werden, während die meisten schädlichen Wirkungen unabhängig davon auftreten, haben sich nachfolgende Untersuchungen und Arbeiten auf die Identifizierung von pharmakologischen Wirkstoffen fokussiert, die direkt auf die sGC-cGMP-Signalübertragung abzielen [56].

#### *Die lösliche Guanylatzyklase (sGC)*

Lösliche Guanylatzyklasen (sGC) sind ubiquitär in den meisten Geweben vorkommende intrazelluläre Rezeptoren für NO, welche die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) in cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) als *second messenger* katalysieren [57]. Bei der sGC handelt es sich um ein heterodimeres Enzym, welches aus einer größeren  $\alpha$ -Untereinheit und einer kleineren häm-bindenden  $\beta$ -Untereinheit besteht. Dabei wurden im Menschen jeweils zwei  $\alpha$ - ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ) und zwei  $\beta$ -Untereinheiten ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ) identifiziert, wobei die Funktion der  $\beta_2$ -Untereinheit bisher noch unklar ist. Je nach  $\alpha$ -Untereinheit wird demnach in zwei Isoenzyme ( $\alpha_1/\beta_1$ ,  $\alpha_2/\beta_1$ ) unterschieden, die jedoch funktionell nicht zu unterscheiden sind [57, 58]. Unterschiede gibt es jedoch in Aminosäuresequenz und -länge je nach Spezies und Isoform, was sich unter anderem in unterschiedlichen Molekulargewichten für die  $\alpha$ - (zwischen 73 und 82 kDa) und  $\beta$ -Untereinheit

(zwischen 73 und 76 kDa) widerspiegelt (www.uniprot.org). Während das  $\alpha_1/\beta_1$ -Heterodimer die wichtigste und ubiquitär exprimierte sGC-Isoform darstellt, wird das  $\alpha_2/\beta_1$ -Heterodimer hauptsächlich im Gehirn exprimiert [59].

Jedes  $\alpha/\beta$ -Polypeptid besteht aus vier Domänen, die vom N- bis zum C-Terminus durch kurze *Linker* verbunden sind: NO-Sensordomäne, PAS-Domäne, Coiled-Coil-Domäne und katalytische Domäne (Abb. 1.2). Nur die NO-Sensordomäne bzw. die N-terminale HNOX-Domäne (*Heme Nitric oxide-Oxygen binding*) der  $\beta$ -Untereinheit ( $\beta$ HNOX) enthält dabei die Häm-Bindungsdomäne. Diese ist über His105 an die prosthetische Häm-Gruppe gebunden, die wiederum gasförmige Liganden wie NO bindet. Die nachfolgende Domäne gehört zur Familie der Per-Arnt-Sim (PAS)-Proteine, benannt nach den ersten drei Proteinen, in denen sie gefunden wurde (*Period clock protein, ARNT protein, Single minded protein*). Diese Domäne leitet Signale durch feine und geringfügige Konformationsänderungen an die Effektordomänen weiter. Auf die PAS-Domäne folgt eine längere Coiled-Coil-Region, deren Hauptfunktion in der Heterodimerisierung des  $\alpha/\beta$ -Polypeptids besteht. Die C-terminale katalytische Domäne der sGC ist zwischen den verschiedenen sGC-Klassen und Untereinheiten hoch konserviert und weist außerdem starke Übereinstimmungen mit den katalytischen Domänen vieler Adenylatzyklasen auf [60]. Um ein aktives katalytisches Zentrum zu bilden, werden die katalytischen Domänen beider Untereinheiten benötigt [57].

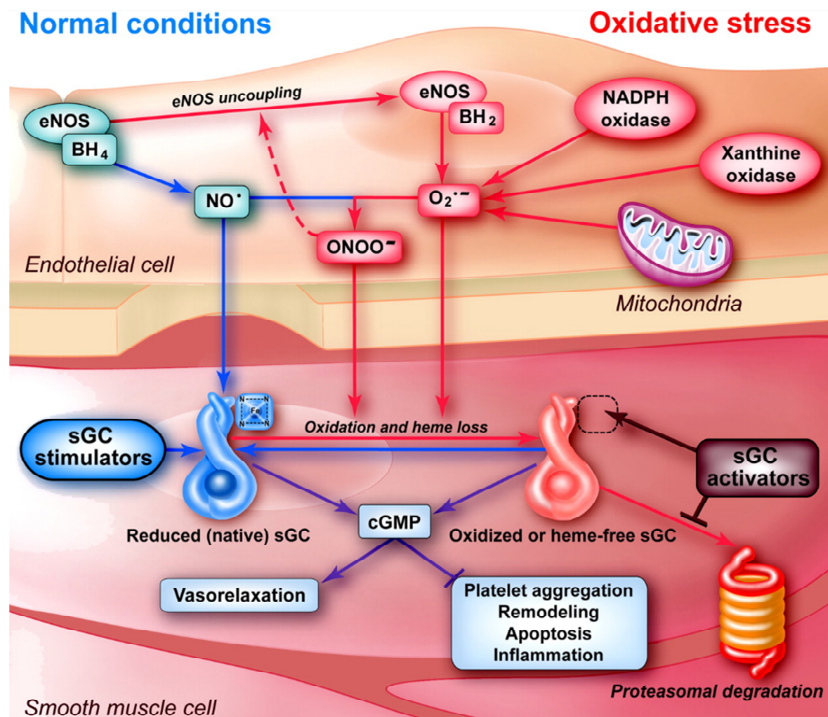


**Abb. 1.2: Strukturelle Organisation der funktionellen Domänen der sGC.** Schematische Darstellung der allgemeinen Architektur der sGC-Domänen. HNOX: *Heme Nitric oxide-Oxygen binding*, PAS: *Per-Arnt-Sim*, CC: *Coiled-Coil*, GC: *Guanylatzyklase*. (adaptiert nach Potter [57], Childers & Garcin [60])

Wichtig für die Aktivierung der sGC ist der Redox-Status der prosthetischen Häm-Gruppe. In ihrem nativen, d.h. reduzierten Zustand bindet NO an das zentrale Eisenatom ( $\text{Fe}^{2+}$ ), und es bildet sich ein

$\text{Fe}^{2+}$ -Nitrosyl-Häm-Komplex, wodurch die sGC aktiviert wird [61]. Die Bindung von NO führt dabei zu einer 100 bis 200fachen Verstärkung der katalytischen sGC-Aktivität [57].

Unter erhöhtem oxidativen Stress kann es nun nicht nur, wie bereits erwähnt, zu verringerten NO-Leveln kommen, sondern die sGC kann auch direkt betroffen sein. ROS und RNOS können die Bindung von NO, durch Oxidation des Eisens in der Häm-Gruppe des Enzyms zu  $\text{Fe}^{3+}$ , verhindern. Danach geht die Häm-Gruppe verloren und die sGC wird schließlich der proteasomalen Degradation zugeführt (Abb. 1.3) [60].



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung der NO-unabhängigen Wirkungsweise von sGC-Modulatoren im gestörten NO-sGC-cGMP Signalweg.** sGC-Stimulatoren aktivieren die sGC direkt durch Bindung an die reduzierte Form des Enzyms, während sGC-Aktivatoren an die oxidierte, häm-freie Form binden.  $\text{BH}_4$ : Tetrahydrobiopterin,  $\text{BH}_2$ : Dihydrobiopterin, cGMP: cyclisches Guanosinmonophosphat, eNOS: endotheliale NO-Synthase, NADPH: Nikotinamidadenindinukleotidphosphat, NO: Stickstoffmonoxid,  $\text{O}_2^-$ : Superoxid, ONOO $^-$ : Peroxinitrit, sGC: lösliche Guanylatzyklase (aus Stasch et al [62])

Die Verbindung zwischen einer gestörten sGC-Funktion und zahlreichen Erkrankungen, hat zur Entwicklung einer neuen Klasse von Arzneimitteln beigetragen, die die Aktivität der sGC durch direkte Interaktion mit diesen Molekülen erhöhen. Substanzen, die direkt auf die sGC wirken, können auf Grundlage ihrer Wirkungsweise in zwei Kategorien unterteilt werden: in sGC-Stimulatoren und sGC-Aktivatoren. Stimulatoren besitzen eine duale Wirkungsweise. Sie stimulieren die native Form des Enzyms direkt und unabhängig von NO, und sie sind außerdem in der Lage, die sGC für niedrige NO-Konzentrationen zu sensibilisieren, indem sie die NO-sGC-Bindung stabilisieren. Im Gegensatz

dazu binden sGC-Aktivatoren an die unbesetzte häm-bindende Domäne, imitieren damit NO-gebundenes Häm und aktivieren so die pathologisch veränderte, häm-freie, NO-unempfindliche Form der sGC (Abb. 1.3) [62].

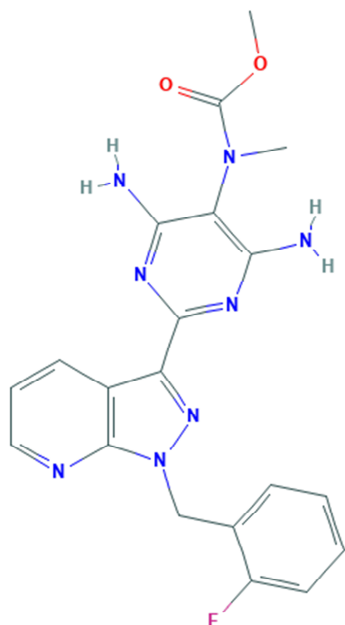
#### *Cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP)*

Cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) ist ein ubiquitärer *second messenger*, der aus GTP in einer durch Guanylatzyklasen katalysierten Reaktion synthetisiert wird. Zu den Rezeptorproteinen von cGMP gehören die Proteinkinase G (cGK oder auch PKG), cGMP-abhängige Kationenkanäle, aber auch Phosphodiesterasen (PDE) [58]. Ein zentraler cGMP-Rezeptor ist die PKG-I (auch cGKI), die eine Schlüsselrolle in der Regulation der Gefäß- und Herzfunktion einnimmt. PKG-I ist ein homodimeres Enzym, das in zwei Isoformen (PKG- $\alpha$ , PKG- $\beta$ ) exprimiert wird. Nach der Aktivierung durch cGMP erfolgt die weitere Signaltransduktion durch die gewebespezifische Phosphorylierung verschiedener Proteine [63]. PDEs hingegen hydrolysieren cyclische Nukleotide, wodurch cGMP auch in cAMP-regulierte Mechanismen wie die der Katecholamine eingreifen kann [64]. cGMP vermittelt also *downstream* verschiedene physiologische und organprotektive Effekte, wie z.B. Vasodilatation, Wachstumsinhibierung glatter Muskelzellen, Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozytenaggregation [56]. Der Mangel an cGMP führt zu einem verminderten PKG Signaling, was folglich in einer Vasokonstriktion, kardialer Hypertrophie sowie krankhaften Veränderungen der Gefäßwände und Inflammation endet, die das Endothel weiter schädigen [65].

#### *Riociguat als NO-unabhängiger Stimulator der sGC*

Die Schlussfolgerung aus dem zuvor Erläuterten ist, dass Medikamente, die in der Lage sind, die sGC direkt zu aktivieren (wie z.B. sGC-Stimulatoren), die vorteilhaften Effekte von NO haben könnten, während die erwähnten negativen Nebenwirkungen, die mit erhöhten NO-Spiegeln verbunden sind, umgangen werden. Für die Therapie sind diese Moleküle daher von besonderem Interesse. Eine in dieser Hinsicht sehr vielversprechende Substanz ist der NO-unabhängige, aber häm-abhängige sGC-Stimulator Riociguat (RIO; BAY 63-2521), der von Bayer HealthCare entwickelt wurde [56]. RIO ist, wie auch seine Vorgängersubstanzen und andere sGC Stimulatoren (z.B. YC-1, BAY 41-2272, BAY 41-8543) in der Lage, die sGC in Abwesenheit von NO direkt zu stimulieren, kann diese aber auch durch die Stabilisierung des Nitrosyl-Häm-Komplexes sensitiver gegenüber geringen Mengen NO machen, da das Enzym so in seiner nativen und aktiven Form verbleibt [66].

RIO stellt hierbei einen optimierten und weiterentwickelten sGC-Stimulator dar, der den vorausgegangenen Indazol-Wirkstoffen sehr ähnlich ist, da er ebenfalls auf der Indazol-Leitstruktur von YC-1 basiert, aber über ein verbessertes pharmakokinetisches Profil verfügt (Abb. 1.4) [66].



**Abb. 1.4: Strukturformel von Riociguat.** 2D-Abbildung der chemischen Struktur von Riociguat, Handelsname Adempas® (BAY 63-2521) von Bayer. (PubChem Identifier: CID 11304743)

In verschiedenen Studien konnten bereits einige Aspekte aufgezeigt werden, die RIO als sGC-Agonist für den klinischen Einsatz interessant machen. So konnte z.B. in einem Rattenmodell mit genetisch bedingter Hypertonie gezeigt werden, dass im Gegensatz zu Nitraten eine direkte sGC-Stimulation keine Toleranzbildung induziert [67]. Weitere präklinische Studien zeigten, dass RIO in experimentellen Renin-Modellen den Endorganschaden reduzierte [68], in Salz-sensitiven Dahl-Ratten Fibrosierung verhinderte und die Überlebensrate verbesserte [69], die Infarktgröße bei Mäusen verringerte [70], in diabetischen *eNOS-Knockout*-Mäusen die Albuminurie reduzierte [71], und dermale Fibrose in Mäusen [72, 73] und experimentelle Fibrose *in vitro* in humanen und murinen Fibroblasten inhibierte [74]. RIO wurde auch in verschiedenen Tiermodellen der pulmonalen Hypertonie (PH) untersucht, darunter in Mäusen unter chronischer Hypoxie, und Ratten, denen subkutan Monocrotalin (ein pneumotoxisches Agens) injiziert wurde. In diesen experimentellen Modellen verbesserte

RIO die pulmonale Hämodynamik und verhinderte bzw. kehrte sogar teilweise Merkmale des pathologischen Remodelings wie eine rechtsventrikuläre Hypertrophie und Muskularisierung der kleinen Lungenarterien um [62].

Aufgrund seiner hohen Wirksamkeit, Spezifität, Effizienz und Sicherheit wurde RIO als Kandidat zur Behandlung verschiedener Formen der PH für klinische Studien ausgewählt. Es stellte den ersten sGC-Stimulator dar, der erfolgreich zunächst in Tierversuchen und dann in kontrollierten klinischen Studien mit Patienten eingesetzt wurde. In randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten Phase-III-Studien in Patienten mit pulmonaler arterieller Hypertonie (PAH) und chronisch thromboembolischer pulmonaler Hypertonie (CTEPH) bewies RIO seine Wirksamkeit ebenfalls im Patienten und wurde schließlich offiziell für die Behandlung dieser beiden Erkrankungen zugelassen, 2013 durch die FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) in den USA und 2014 durch die EMA (*European Medicines Agency*) in Europa. Die Vermarktung erfolgt unter dem Namen Adempas® [75].

### 1.3 **Cardiomics: integrative kardiovaskuläre Analysen auf Transkriptom- und Proteomebene**

Mit der Entwicklung verschiedener Hochdurchsatztechnologien wie *Next-Generation-Sequencing* (NGS) und massenspektrometrischen Proteomanalysen und den zahlreichen Variationen dieser Strategien haben sich Untersuchungen zu kardiovaskulären Erkrankungen von kandidatenbasierten Analysen zu globalen *Whole-Genome*-, Transkriptom- und Proteomanalysen gewandelt. Diese Hochdurchsatzverfahren haben dabei die Möglichkeiten zur Untersuchung regulatorischer Gesamtnetzwerke enorm verbessert und erweitert [76, 77].

Transkriptomanalysen bzw. *Transcriptomics* beschreiben im Allgemeinen die Quantifizierung und Charakterisierung der gesamten RNA-Population (Transkriptom), die in einem bestimmten Zelltyp bzw. Zelle oder einem bestimmten Gewebe und unter verschiedenen biologischen Bedingungen vorliegt [78]. Die differentielle Genexpressionsanalyse, bei der Transkriptomdatensätze verschiedener biologischer Zustände verglichen werden, um veränderte Mengen von Genprodukten (Transkripten) zu identifizieren, ist mittlerweile zur Grundlage vieler Untersuchungen geworden [79, 80]. Insbesondere die RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) hat heutzutage unzählige Anwendungen in den Bereichen der Genetik und verschiedenen biomedizinischen Bereichen. RNA-Seq umfasst dabei ein relativ einfaches experimentelles Prozedere von RNA-Extraktion bis zur Generierung von cDNA-Bibliotheken und hat aufgrund der sinkenden Kosten für NGS und des geringer werdenden Rechenaufwandes für die Datenverarbeitung eine zentrale Rolle in der modernen Biologie [80]. RNA-Seq liefert auch eine weitaus präzisere Messung der Transkriptlevel und verschiedener Isoformen als andere Methoden. Diese Technologie hat sich seit den Jahren ihrer Entwicklung in Bezug auf die Datenqualität dramatisch verbessert und bietet z.B. im Vergleich zu Microarrays einen größeren dynamischen Bereich in der Detektion von Expressionsleveln, eine höhere Sequenzabdeckung und weniger artefaktbedingte Störungen wie erhöhte Hintergrundsignale durch Kreuzhybridisierung bei hybridisierungsbasierten Methoden [81].

Für RNA-Seq-Analysen stehen verschiedene NGS-Plattformen zur Verfügung (z.B. Illumina®, Thermo Fisher Scientific, PacBio®, BGI Genomics, Oxford Nanopore Technologies, etc.). Die meisten basieren auf der *Sequencing-by-Synthesis* Technologie und der Standardablauf beinhaltet die RNA-Extraktion, gefolgt von mRNA-Anreicherung, cDNA-Synthese und der Vorbereitung einer Adapter-ligierten Sequenzierbibliothek [82, 83]. Der exponentielle Anstieg der Datengenerierung und die Senkung der Kosten pro sequenzierter Base wurden vor allem durch die zunehmende Massen-Parallelsequenzierung mittels *Short-Read*-Sequenzierungsplattformen wie Illumina® ermöglicht.

Obwohl die Länge der *Reads* zugenommen hat, weisen die meisten Plattformen weiterhin relativ kurze *Reads* in der Größenordnung von 35-300 Basen pro *Read* auf. Illumina® kompensiert dessen kurze *Reads* (max. 150 bp) durch die sogenannte *paired-end* Sequenzierung, bei der jedes Ende desselben DNA-Moleküls bis zur vollen Länge sequenziert wird. Da die ungefähre Größe des Inserts bekannt ist, verbessert die *paired-end* Information das Alignment im Vergleich zu *single-end Reads* erheblich. Mittlerweile dominieren die Systeme von Illumina® die NGS-basierte Forschung bzw. sind sie anderen Methoden überlegen [84]. Diese Überlegenheit spiegelt sich sowohl in der Literatur als auch in der Menge an Daten wider, die im *Sequence Read Archive* (SRA) als Repository für Hochdurchsatz-Sequenzierungsdaten hinterlegt sind, und verdeutlicht dessen Effizienz und Leistungsfähigkeit [85]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine Sequenzierungsplattform von Illumina für die Transkriptomanalysen genutzt (Illumina®, HiSeq4000).

Die Herausforderung der RNA-Seq besteht nicht zuletzt jedoch in der Prozessierung und Analyse der detektierten *Sequence Reads* und im Umgang mit der generierten, enormen Datenmenge, für die entsprechende Hardware und eine effiziente Methodik zur Weiterverarbeitung benötigt werden. Moderne Sequenzierer und bioinformatische Algorithmen zur Datenanalyse haben die Qualität der Ergebnisse in den letzten Jahren drastisch verbessert und es gibt mittlerweile gut etablierte Bioinformatik-Pipelines, um die verschiedenen Aspekte der Analyse zu adressieren. Wichtige Punkte, auf die hierbei zu achten sind, wären die initiale Qualitätskontrolle (QC) der Sequenzierungsdaten, gefolgt vom Alignment bzw. Mapping der identifizierten Sequenzen mit einem Referenzgenom und der Wahl der passenden Strategie bzw. des *Tools* zur differentiellen Genexpressionsanalyse [80, 83]. Bei der Expressionsanalyse ist zu beachten, dass neben der Anzahl der zugeordneten *Reads* pro Transkript, auch die Länge der entsprechenden Transkripte eine Rolle spielt, da längere Transkripte auch durch eine höhere Anzahl an Reads repräsentiert werden können. Auch sind die Zusammensetzung der sequenzierten RNA-Population und die unterschiedliche Gesamtanzahl an Reads zwischen den zu vergleichenden Proben wichtig. Daher sollte dies bei der Analyse mittels geeigneter Algorithmen und Normalisierungsmethoden berücksichtigt und reguliert werden [86, 87].

Proteomanalysen bzw. *Proteomics* beschreiben die Untersuchung der Gesamtheit aller Proteine (Proteom), die zu einem bestimmten Zeitpunkt unter bestimmten Bedingungen in einem biologischen System existieren [88, 89]. Dabei ist das Proteom weitaus komplexer als es die Ein-Gen-ein-Enzym-Hypothese von Beadle und Tatum 1941 vermuten ließ. Es beinhaltet nicht nur die direkt translatierten Proteine, sondern schließt auch die Vielzahl modifizierter Proteine mit ein, die z.B. durch alternatives *Splicing*, post-translationale Prozessierung oder durch Kombination aus beidem entstehen [90].



Parallele Transkriptom- und Proteomanalysen haben gezeigt, dass durch diese prä- und post-translationalen Modifikationen oft unterschiedliche Proteine von einem Gen ausgehend kodiert werden [91]. Proteine sind gewissermaßen an allen zellulären Funktionen und regulatorischen Mechanismen beteiligt, und sie sind bei Erkrankungen verändert – ob als Ursache oder Effekt, in ihrer Abundanz oder Struktur. Sie bestimmen daher den Phänotyp der einzelnen Zelle und des Gewebes oder Organs, welches diese Zellen beinhaltet. Die Proteomik ist darauf ausgerichtet, die Änderungen in der Proteinmenge und -modifikation zu identifizieren und zu charakterisieren [92].

Proteomanalysen stützen sich stark auf die Massenspektrometrie (MS), wobei diese MS-basierten Analysen in den letzten Jahren immer weiterentwickelt wurden und durch den stetigen technischen Fortschritt und die Verbesserung der Geräte im Hinblick auf Handhabbarkeit, Massenauflösung und Massengenauigkeit immer mehr in den Vordergrund rücken [93, 94]. Exakte Analysen komplexer Proteome erfordern aber nicht nur leistungsfähige Massenspektrometer, sondern auch eine effektive Probenaufarbeitung und die präzise Arretierung des Proteoms zum gewünschten Zeitpunkt. Andernfalls können weitere zelluläre Prozesse die zu untersuchenden Proteine weiter verändern, wie z.B. durch Anlagerung oder Entfernung von Modifikationen bis hin zur Proteindegradation [90]. Je nach Zielstellung des Versuchs und Art der aufzuarbeitenden Probe gibt es dafür verschiedene Möglichkeiten. Bei der Proteinextraktion aus Geweben beispielsweise ist die Bearbeitung der Proben unter gekühlten Bedingungen auf Eis essentiell, um jede Enzymaktivität zu hemmen, da degradierende Enzyme wie Proteasen auch außerhalb der Zelle in komplexen Proteingemischen ihre Aktivität nicht verlieren. Eine weitere Möglichkeit stellt die Denaturierung der Proteine in einem Harnstoff/Thioharnstoff-Puffer (Urea/Thiourea, UT) dar [95, 96].

Die grundlegende Funktion eines Massenspektrometers ist die Detektion des Verhältnisses von Masse-zu-Ladung ( $m/z$ ) von ionisierten Biomolekülen. Die eigentliche Analyse von komplexen Proteinproben erfolgt dabei meist auf Peptidebene nach enzymatischem Verdau (*Bottom-Up Proteomics*). Eine weitere Analysestrategie, die sich in den letzten Jahren etabliert hat, ist der Ansatz der *Top-Down Proteomics* auf Proteinebene. Hierbei werden intakte Proteine direkt im Massenspektrometer analysiert [97]. Dieser Ansatz (*Top-Down*) fand in der vorliegenden Arbeit jedoch keine Anwendung und soll zur Vollständigkeit an dieser Stelle deshalb nur kurz erwähnt sein. Bevor die Proben in das MS eingeleitet werden, erfolgt meist eine Präfraktionierung bzw. Auftrennung der Peptidgemische entsprechend ihrer physikochemischen Eigenschaften mittels Flüssigchromatographie (*Liquid Chromatography, LC*). Hierbei werden die Peptidgemische in einer mobilen Phase gelöst und über die Interaktion mit einer stationären Phase aufgetrennt, sodass sie zu definierten Retentionszeiten eluieren. Die Separation mittels sogenannter Umkehrphasen-

Hochleistungsflüssigchromatographie (*Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*, RP-HPLC), bei der hydrophobe Wechselwirkungen an Kohlenwasserstoffketten auf der stationären Phase zur Retardierung genutzt werden, wird dabei häufig herangezogen. Die dadurch erzeugte Verringerung der Probenkomplexität vor einer anschließenden MS-Analyse ist unerlässlich, um Koelutionen zu minimieren und somit den dynamischen Bereich der MS-Detektion zu vergrößern [98, 99].

Nach proteolytischem Verdau der Proteine müssen die generierten Peptide nach erfolgter LC im Massenspektrometer zunächst ionisiert werden. Je nach System wird dies auf unterschiedliche Weise erreicht [100]. Eine häufig angewandte Methode ist die Elektrospray-Ionisation (ESI). In einer dünnen Kapillare werden die Peptide in Gegenwart einer Protonenquelle (organische Säuren wie Ameisen- oder Essigsäure) einer hohen elektrischen Spannung ausgesetzt, wodurch es an der Spitze der Kapillare zur Ionisation der Peptide kommt. Die bei der RP-HPLC verwendeten Lösungsmittel ermöglichen eine direkte Kopplung mit der ESI (LC-ESI) und das von Fenn et al. etablierte ESI-Verfahren die schonende Überführung ionisierter Biomoleküle aus der wässrigen Phase in die Gasphase, was deren massenspektrometrische Detektion und Analyse erlaubt [101]. Die ionisierten Peptide gelangen anschließend ins MS und werden, wie bereits erwähnt, anhand ihrer Masse-zu-Ladung-Verhältnisse ( $m/z$ ) im Massenanalysator aufgetrennt und vom Detektor registriert. Hierbei stehen verschiedene Massenanalysatoren für die Selektion der Ionen zur Verfügung, wie z.B. Quadrupol-Massen-Filter, Ionenfallen oder Flugzeitanalysatoren [102].

Die jeweilige Kombination von Einlass-System, Ionenquelle und Massenanalysator bestimmt den Typ eines Massenspektrometers und somit die Eigenschaften des Systems. In der vorliegenden Arbeit wurde ein LTQ-Orbitrap Velos™ Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Bei diesem Gerät handelt es sich um ein Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) bestehend aus einer linearen Quadrupol-Ionenfalle (*Linear Trap Quadrupol*, LTQ) und einem Orbitrap-Detektor. Bei einer Tandem-MS/MS-Analyse wird in einem ersten MS-Lauf zunächst die Masse des ionisierten Peptides von Interesse bestimmt, ehe es in einem zweiten MS-Lauf ausgewählt, durch Kollision mit einem Inertgas weiter fragmentiert und die somit erzeugten Bruchstücke analysiert werden, wodurch eine Identifizierung der Aminosäurefolge im Peptid und eine Quantifizierung möglich ist [103, 104]. Eine relative Quantifizierung kann dabei durch den Vergleich der gemessenen Signalintensitäten der entsprechenden Ionen verschiedener Proben erfolgen. Bei dem Vergleich mehrerer Messungen sollte dabei eine Normalisierung der Werte stattfinden, da die Intensitäten durch kleinere Unterschiede bei der LC-Auftrennung oder in der Elektrospraystabilität variieren können [105].

Lange Zeit war mRNA die am meisten untersuchte RNA-Spezies, da das zentrale Dogma der Molekularbiologie den genetischen Informationsfluss von der DNA über die mRNA zum Protein beschreibt [106, 107]. Allerdings haben mittlerweile viele Arbeiten die Bedeutung von nicht-kodierenden Transkripten und anderen RNA-Spezies (z.B. kleine und lange nicht-kodierende RNAs) vor allem in der kardiovaskulären Forschung aufgedeckt [108]. Dabei war RNA-Seq unerlässlich für die Systematisierung dieser nicht-translatierten RNA-Molekülklassen wie *long noncoding* RNAs (lncRNA), kleine nukleäre RNAs und insbesondere microRNAs, und bietet die Möglichkeit, Profile dieser RNA-Klassen in einem enormen Umfang zu erstellen [80].

Von besonderer Bedeutung sind hierbei microRNAs, da sie an der Regulation der Genexpression unter Normal- und pathophysiologischen Bedingungen beteiligt sind [109, 110]. Bei microRNAs handelt es sich um hochkonservierte, ca. 22 Nukleotide (nt) kurze und einzelsträngige, nicht-kodierende RNAs, die überwiegend repressive Effekte auf die Genexpression auf post-transkriptionaler Ebene vermitteln. Durch Basenpaarung mit ihrer Ziel-mRNA, die nicht zwingend vollständig komplementär sein muss, kommt es zu Translationsrepression oder Transkriptdegradation [111, 112]. Die Regulation durch microRNAs ist dabei sehr komplex, da einerseits eine einzige microRNA hunderte verschiedene mRNAs beeinflussen und andererseits eine einzelne mRNA durch mehr als eine microRNA reguliert werden kann. MicroRNAs sind schätzungsweise an der Regulation von bis zu 60% aller humanen Protein-kodierenden Gene auf post-transkriptionaler Ebene beteiligt [113].

Die meisten microRNAs werden von der RNA-Polymerase II als langes primäres microRNA-Transkript (pri-miRNA) transkribiert, welches von der Endoribonuklease Drosha zu einer ca. 70 nt langen Haarnadelstruktur mit einem 2 nt langen Überhang am 3'-Ende (pre-miRNA) gespalten wird [114]. Die pre-miRNA wird anschließend in das Zytoplasma exportiert und von einer zweiten Endoribonuklease, Dicer, zu einem ~22 nt langen miRNA:miRNA\*-Duplex mit unvollständiger Komplementarität prozessiert. Einer der Stränge (*guide strand*) verbindet sich dann mit dem Argonaut-Protein (AGO) zum RISC-Komplex (*RNA-induced silencing complex*), während der zweite Strang (*passenger strand*, miRNA\*) degradiert wird [115]. Ob der 5p- oder der 3p-microRNA-Strang des Duplex (d.h. der vom 5'- oder 3'-Ende der pre-miRNA-Haarnadelstruktur stammende Strang) zum Führungsstrang wird, hängt zum Teil von dessen thermodynamischer Stabilität ab. Meist wird der Strang mit der schwächsten Bindung am 5'-Ende dabei zum Führungsstrang. Allerdings kann es auch dazu kommen, dass bei bestimmten microRNAs beide Stränge zu gleichen Teilen in den RISC geladen werden, während bei anderen ein Strang dominiert [116]. Das Targeting erfordert typischerweise eine komplementäre Basenpaarung zwischen bestimmten Regionen der microRNA

und ihrer Ziel-mRNA (*Target*). Die als „Seed“-Region bezeichneten Nukleotide 2-7 innerhalb der microRNA (vom 5'-Ende aus) beschreiben dabei die kanonischen Positionen, die mit den komplementären Stellen innerhalb des *Targets* übereinstimmen müssen [117]. Auch wenn diese spezifische Paarung in den meisten Fällen notwendig ist, gibt es mittlerweile jedoch auch einige Beispiele für unvollständige Komplementarität in der „Seed“-Region, die sich als ausreichend für eine funktionale Regulation erwiesen hat, oder auch Regulationsabhängigkeit und *Target*-Erkennung jenseits der „Seed“-Region [118].

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das grundlegende Ziel dieser Arbeit war es, das protektive Potential von Riociguat (Adepas®, BAY 63-2521) auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz genauer zu charakterisieren. Hierbei handelte es sich um die wissenschaftliche Abklärung nicht hinreichend untersuchter pharmakologischer Sachverhalte, da Riociguat im klinischen Rahmen bisher nur Patienten verabreicht wird, die an verschiedenen Formen von pulmonaler Hypertonie leiden. Vorangegangene Studien hierzu ließen aber bereits erste positive und kardioprotektive Effekte abseits der pulmonalen Hypertonie vermuten. Zu Beginn der Arbeit war allerdings nicht bekannt, inwieweit diese Substanz auch vor der Ausprägung einer chronischen Herzinsuffizienz schützen kann. Dadurch könnten sich interessante pathophysiologische Konzepte ergeben, die auch therapeutische Konsequenzen beim Menschen in Aussicht stellen würden. Die vorliegende tierexperimentelle Studie sollte daher dazu beitragen, Riociguat im Hinblick auf eine positive Beeinflussung von Hypertrophie und Herzinsuffizienz in einem murinen Modell der induzierten Nachlasterhöhung durch eine transverse Aortenkonstriktion zu testen, und die Wirkmechanismen dieser relativ neuartigen Substanz genauer aufzuklären. Hierbei war es unerlässlich, ein *in vivo* Modell zu nutzen, um die Remodelingprozesse des Herzens im Zusammenspiel von kardialer Kontraktion und hormoneller Regulation abzubilden.

Folgende Punkte sollten dabei besondere Beachtung finden: (i) wie wirkt sich eine Langzeitmedikation auf die kardiale Funktion, Hypertrophie und Fibrose aus, (ii) welche transkriptionalen und proteinregulatorischen Veränderungen liegen dem zugrunde – insbesondere im linken Ventrikel, und (iii) welche regulatorische Rolle nehmen dabei eventuell microRNAs ein. Um diese Fragestellungen zu beantworten, waren zunächst echokardiographische Untersuchungen vorgesehen, die über den gesamten Versuchszeitraum hinweg wöchentlich begleitend durchgeführt wurden. Zum Versuche sollten anschließend histologische Untersuchungen zu Hypertrophie und Fibrose erfolgen. Im Weiteren waren sowohl mRNA- als auch microRNA-Sequenzierungen und markierungsfreie massenspektrometrische Proteomanalysen der linken Ventrikel vorgesehen. Dadurch sollten die mit möglichen funktionellen Änderungen unter Riociguatbehandlung einhergehenden molekularen Veränderungen im verwendeten Maus-Modell aufgedeckt werden, um die pharmakologische Wirkung von Riociguat besser zu verstehen, oder aber auch mögliche Nebeneffekte zu erkennen.



## 2. Material

### 2.1 Chemikalien und Substanzen

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Acetonitril	J.T. Baker, Deventer, NL
Ammoniumbicarbonat (ABC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Avidin	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bradford-Reagenz	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Buprenorphinhydrochlorid (Buprenovet® 0,3 mg/ml)	Bayer, Leverkusen, DE
Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
DAPI	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Diethylenglycolmonoethylether (Transcutol®, CARBITOL™)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DPBS, w/o: Ca + Mg	PAN-Biotech, Aidenbach, DE
Entellan® Neu	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Essigsäure für MS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Fluorescence Mounting Medium	Dako, Carpinteria, CA, USA
Formaldehydlösung (Roti®-Histofix, 4%)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Goat Serum (Normal)	Dako, Carpinteria, CA, USA
Harnstoff	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
HPLC-grade Wasser	J.T. Baker, Deventer, NL
Iodacetamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isofluran CP®	CP-Pharma, Burgdorf, DE
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Laemmli Probenpuffer (2x)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Macroglyglycerolricinoleat (Cremophor® EL)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid 0,9 % Injektionslösung	B. Braun, Melsungen, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Präoperative Hautdesinfektion (Braunoderm®)	B. Braun, Melsungen, DE
QIAzol®	QIAGEN, Hilden, DE
Riociguat (Adempas®)	Bayer, Leverkusen, DE
Salzsäure (≥32%)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
TEMED	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Thioharnstoff	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Thiopental-Natrium (Trapanal® 0,5 g)	Inresa Arzneimittel, Freiburg, DE
Tissue-Tek® O.C.T.™ Einbettmedium	Sakura Finetek, Tokyo, JP
Tissue-Tek® Paraffin	Sakura Finetek, Tokyo, JP
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Triton X® 100	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe, DE

## 2.2 Verbrauchsmittel

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Adhäsions-Objektträger (SuperFrost®)	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
Deckgläser	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
Depilationscreme	Reckitt Benckiser Healthcare, Kingston upon Hull, UK
Desinfektionstücher (Mikrocid® sensitive wipe premium)	Schülke & Mayr, Norderstedt, DE
Einmalkanülen BD Microlance™ 3	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Einmal-Spritzen (Injekt®-F)	B. Braun, Melsungen, DE
Faden 6/0 DSM 11 (POLYESTER-S grün)	Catgut, Markneukirchen, DE
Faden 7/0 2xHRM 20-6 (MAPROLEN blau)	Catgut, Markneukirchen, DE
Falcon-Röhrchen (15 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Falcon-Röhrchen (50 ml)	Corning Life Science, Corning, NY, USA



<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Handschuhe, Nitril (Peha-Soft®)	Paul Hartmann, Heidenheim, DE
KIMTECH Science Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark Professional, Surrey, UK
Low binding MCT (0,65 ml, 1,7 ml, 2 ml)	Sorenson BioScience, Salt Lake City, UT, USA
Medizinische Pflaster (Transpore™)	3M Health Care, St. Paul, MN, USA
Micro-Insert (0,1 ml)	VWR International, Darmstadt, DE
Micro-Pistills	Eppendorf, Hamburg, DE
Microtiterplatten (96-Well, F-bottom)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Microvials (1,5 ml)	VWR International, Darmstadt, DE
MS-Pipettenspitzen (200 µl StackPack)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
MS-Pipettenspitzen (epT.I.P.S. 10 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipettenspitzen (10 µl)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Pipettenspitzen mit Filter (SurPhob SafeSeal® LOW BINDING, RNase free)	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, DE
Prospekthüllen DIN A4	Q-CONNECT, Gent, BE
Reaktionsgefäße (0,25 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Reaktionsgefäße (2 ml)	Eppendorf, Hamburg, DE
Schlündelnadeln	Cadence Science, Cranston, RI, USA
Schraubflaschen	Schott, Mainz, DE
Schraubkappe (PP, 8 mm, mit Loch)	VWR International, Darmstadt, DE
Septum-Scheiben (8mm, Silikon)	VWR International, Darmstadt, DE
Tissue-Tek® Ausgießformen	Sakura Finetek, Tokyo, JP
Tissue-Tek® Cryomold® Kryoeinbettformen	Sakura Finetek, Tokyo, JP
Tissue-Tek® Einbettkassetten	Sakura Finetek, Tokyo, JP
Ultraschall-Gel	Sonogel, Bad Camberg, DE
VaporGuard™ Activated Charcoal Filter	VetEquip, Livermore, CA, USA
Vasofix® Safety (24G Venenkatheter)	B. Braun, Melsungen, DE
Wägeschalen	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Zellstofftupfer (Pur-Zellin®)	PAUL HARTMANN, Wiener Neudorf, AT
ZipTip® Spitzen (µ-C18)	Merck Millipore, Darmstadt, DE

## 2.3 Versuchstiere

Bezeichnung	Stamm	Lieferant
Mäuse, männlich	C57BL/6N	Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany

## 2.4 Enzyme, Kits und Standards

Bezeichnung	Hersteller
Agilent High Sensitivity DNA Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
LysC ( <i>Lysobacter enzymogenes</i> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
miRNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden, DE
nCounter® Elements™ Master Kit	NanoString Technologies, Seattle, WA, USA
Cartridges	
Prep Plates	
Prep Kit	
nCounter® TagSets (Reporter + Capture Tags)	NanoString Technologies, Seattle, WA, USA
Oligonukleotid-Sondenpaare	Integrated DNA Technology (IDT), Coralville, IA, USA
nCounter® Plate Probe A	
nCounter® Plate Probe B	
Picro-Sirius Stain Kit (For Cardiac Muscle)	ScyTek Laboratories, Logan, UT, USA
Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards, Strep-tagged recombinant	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Precision Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Seq. Grade Modified Trypsin, porcine	Promega Corporation, Madison, WI, USA
TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kits (7,5%, 10%, 12%)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini Nitrocellulose Transfer Kit	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
TruSeq® Small RNA Library Preparation Kit	Illumina, San Diego, CA, USA

## 2.5 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Kat.-Nr.	Verdünnung
Anti-ANKRD1 rabbit pAb	Abcam	ab64963	WB: 1:2500
Anti-Collagen I mouse mAb	Abcam	ab88147	WB: 1:1000
Anti-Dystrophin mouse mAb	Sigma-Aldrich	D8043	IHC: 1:500
Anti-MYH7B rabbit pAb	Abcam	ab172967	WB: 1:50000
Anti-Periostin rabbit pAb	Abcam	ab14041	WB: 1:5000
Anti-Phospholamban (phospho S16) rabbit pAb	Abcam	ab15000	WB: 1:5000
Anti-Phospholamban mouse mAb	Abcam	ab2865	WB: 1:5000
Anti-PSMC5 rabbit mAb	Abcam	ab178681	WB: 1:50000
Goat anti-Mouse IgG (H+L), Alexa Fluor® 488 conjugate	Invitrogen	A-11001	IHC: 1:200
Goat Anti-Mouse IgG (H+L), HRP conjugate	Bio-Rad	172-1011	WB: 1:10000
Goat Anti-Rabbit IgG (H + L), HRP conjugate	Bio-Rad	170-6515	WB: 1:10000

(WB: Western Blot, IHC: Immunhistochemie)

## 2.6 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Bravo-Plattform	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
ChemiDoc™ XRS+ Imaging System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
CryoStar™ NX50 Kryostat + Mikrotom	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Dewar Transportgefäß	KGW Isotherm, Karlsruhe, DE
Echokardiographie-Schallkopf (MicroScan™ MS400)	FUJIFILM VisualSonics, Toronto, CAN
Echokardiographie-System (Vevo® 2100)	FUJIFILM VisualSonics, Toronto, CAN
Feinwaage (CPA324S)	Sartorius, Göttingen, DE
Folienschweißgerät	SEVERIN Elektrogeräte, Sundern, DE
Heraeus™ Brutschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus™ Fresco™ 17/21 Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
HeraSafe™ Sterilwerkbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
HiSeq® 4000 Sequencing System	Illumina, San Diego, CA, USA
HistoStar™ Ausgießstation	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Infrarot-Leuchte IL21	Carl Roth, Karlsruhe, DE

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Isofluranverdampfer (Vapor 19.3)	Drägerwerk, Lübeck, DE
Kaltlichtlampe KL 1500 LCD	Schott, Mainz, DE
Kompaktes Fluoreszenz-Mikroskop (BZ-9000)	Keyence, Osaka, JP
LabChip® Nucleic Acid Analyzer	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
LTD Orbitrap Velos™ Massenspektrometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Magnetrührer MR2000, MR3000	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
Magnetrührstäbe	VWR International, Darmstadt, DE
Mikro-Dismembrator S + Zubehör	Sartorius, Göttingen, DE
Mikroskop (Mantis Compact)	Vision Engineering, Surrey, UK
Mini-PROETAN® Tetra Elektrophoresesystem + Zubehör	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
MiniStar Mikrozentrifuge	VWR International, Darmstadt, DE
MiniVent Ventilator (Model 845)	Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA
nanoACQUITY BEH130 C18 analytische Säule (10 cm x 100 µm, 1,7 µm)	Waters Corporation, Milford, MA, USA
nanoACQUITY UPLC 2G-V/M Trap Symmetry C18 Vorsäule (2 cm x 180 µm, 5 µm)	Waters Corporation, Milford, MA, USA
nanoACQUITY UPLC®	Waters Corporation, Milford, MA, USA
nCounter® Analysis System Prep Station (Liquid Handling Robot) Digital Analyzer (Automated Epifluorescence Scanner)	NanoString Technologies, Seattle, WA, USA
OP-Besteck	Fine Science Tools, Heidelberg, DE
pH-Meter MP230	Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA
PicoTip® Emitter	New Objective, Woburn, MA, USA
Pipetten (PIPATMAN® Classic)	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipetten (Research® plus)	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipettierhilfe	BaackLab, Schwerin, DE
Pippin Prep™	Sage Science, Beverly, MA, USA
PowerPac 200/300 (HC, Basic)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Präzisionswaage Acculab Atilon	Sartorius, Göttingen, DE
STP 120 Gewebereinbettungsautomat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Temperatursonde	SA Instruments, Stony Brook, NY, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, DE

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Trockenschrank	Memmert, Schwabach, DE
Ultraschallhomogenisator (SONOPULS HD 2200): HF-Generator (GM 2200) Ultraschallwandler mit Boosterhorn (UW 2200+SH 213 G) Mikrospitze (MS 72)	Bandelin electronic, Berlin, DE
VarioSkan™ Flash Multimode Reader	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Vortexer Reax 2000	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
Wippschüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
Zubehör für 1D-PAGE	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

## 2.7 Software

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
BZ-II Analyzer	Keyence, Osaka, JP
Genedata Analyst™ 10.0.3	Genedata, Basel, CH
GIMP 2.10	GNU Project, Cambridge, MA, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
ImageJ	LOCI, Madison, WI, USA
ImageLab™ 6.0.1	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®)	QIAGEN, Hilden, DE
Inkscape 0.92	Software Freedom Conservancy, Brooklyn, NY, USA
MaxQuant 1.5.3.8	Cox Group, MPI of Biochemistry, Martinsried, DE
Microsoft® Office 2016	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
nSolver™ 4.0	NanoString Technologies, Seattle, WA, USA
Preview™	Protein Metrix, Cupertino, CA, USA
Skantl 2.4.3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Vevo® LAB 3.0.0	FUJIFILM VisualSonics, Toronto, ON, CA



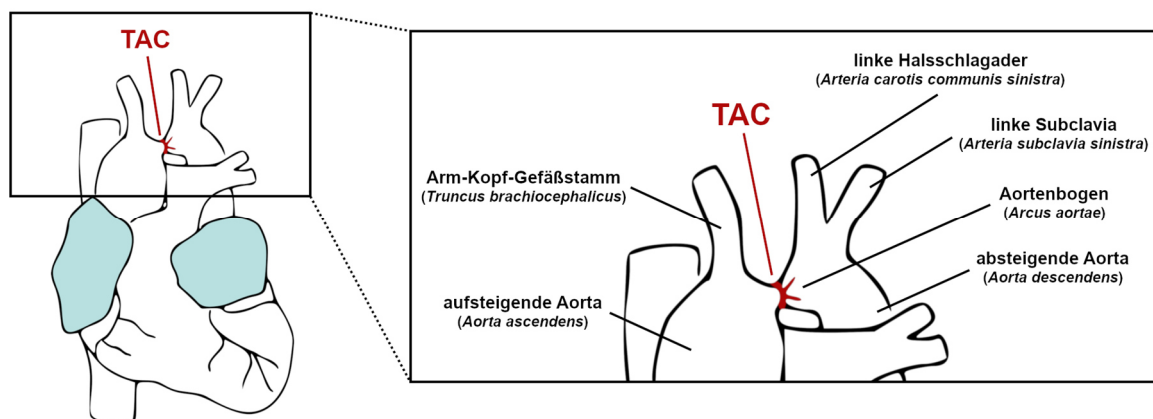
## 3. Methoden

### 3.1 Tierexperimentelle Arbeiten

Für die tierexperimentellen Arbeiten wurden acht Wochen alte, männliche C57BL/6N Mäuse der Firma Charles River Laboratories verwendet. Alle Operationen und Untersuchungen erfolgten nach Genehmigung des Versuchsvorhabens durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei (LALLF) Mecklenburg-Vorpommern (AZ: 7221.3-1-006/16).

#### 3.1.1 Transverse Aortenkonstriktion (TAC) in der Maus

Die transverse Konstriktion der Aorta (*transverse aortic constriction*, TAC) als Last- bzw. Krankheitsmodell ist eine etablierte Methode, um druckinduzierte linksventrikuläre Hypertrophie und Herzinsuffizienz zu generieren. Der Durchmesser des Aortenbogens (*Arcus aortae*), zwischen Arm-Kopf-Gefäßstamm (*Truncus brachiocephalicus*) und linker Halsschlagader (*Arteria carotis communis sinistra*), wird dabei auf ein definiertes Maß verringert und so der Druck auf den linken Ventrikel massiv gesteigert (Abb. 3.1). Diese stark erhöhte Nachlast führt zunächst zu kompensatorischen Anpassungsprozessen wie der Hypertrophie bei weitgehend erhaltener Pumpleistung, mündet aber relativ schnell in eine Herzinsuffizienz mit Ventrikeldilatation und stark verminderter Herzfunktion [36, 38].



**Abb. 3.1:** Schematische Darstellung der transversen Aortenkonstriktion (TAC) durch Abbinden des Aortenbogens. (Modifizierte Darstellung nach Tarnavski, 2009)

Die Tiere wurden randomisiert unter Planung durch Dr. Karina Grube, Klinik für Innere Medizin B, Universitätsmedizin Greifswald, in die Operationsgruppen (TAC, Sham) eingeteilt. Die Operationen wurden von Dr. Julia Rüdibusch, Klinik für Innere Medizin B, Universitätsmedizin Greifswald, durchgeführt.

Initial wurden die Mäuse mit 3% Isofluran sediert, auf dem Rücken liegend fixiert (Transpore™) und endotracheal intubiert. Zur Intubation wurde der Kopf der Maus leicht überstreckt, die Zunge vorsichtig mit einer Pinzette herausgezogen und der Hals mit einer Kaltlichtlampe beleuchtet. In die nun sichtbare Trachea konnte dann vorsichtig ein als Tubus verwendeter Venenkatheter (Vasofix®, 24G) eingeführt werden. Das Ende des Katheters wurde an die Beatmungseinheit (MiniVent) angeschlossen und das Tier anschließend mit einem Gemisch aus 2% Isofluran in Raumluft beatmet (200 µl Tidalvolumen, 200 Atemzüge/min). Zur Analgesie wurden 0,02 mg/kg Körpergewicht Buprenorphinhydrochlorid s.c. injiziert. Der Brustbereich wurde von Fell befreit (Depilationscreme) und desinfiziert (Braunoderm®), anschließend die Haut eröffnet und der Thorax freigelegt. Der Brustkorb wurde mittels medianer Sternotomie bis zur dritten Rippe eröffnet und mit Hilfe eines Retraktors leicht gespreizt, um Zugang zu Herz und Aortenbogen zu erlangen. Eine abgestumpfte Kanüle (26G) wurde auf dem Aortenbogen platziert und ein 7-0 Faden zwischen *Truncus brachiocephalicus* und der *Arteria carotis communis sinistra* um sowohl Aorta als auch Kanüle gebunden und festgeknotet. Nachdem die Nadel wieder schnell entfernt wurde, war die Aorta nun dauerhaft auf einen definierten Durchmesser von 0,45 mm konstringiert. Der Thorax wurde mittels Einzelknopfnahmt, die Haut mittels fortlaufender Naht mit einem 6-0 Faden geschlossen. Abschließend wurde die Hautnaht nochmals desinfiziert und die Narkose ausgeleitet. In einem separaten Käfig wurden die frisch operierten Tiere bis zum Erwachen und der vollständigen Wiedererlangung der Mobilität mit einer Wärmelampe bestrahlt und nachbeobachtet. Postoperativ erhielten die Tiere 3 Tage lang (alle 12 h) weiterhin Buprenorphin (0,02 mg/kg, s.c.) zur Analgesie.

Als Kontrollgruppe dienten Tiere, die eine Schein-Operation ohne Aortenkonstriktion durchlaufen hatten (Sham, *sham surgery*). Bei diesen wurde ebenfalls der Brustkorb eröffnet, der Aortenbogen exponiert, aber nicht ligiert.

### 3.1.2 Medikamentöse Behandlung

Das verwendete Medikament Riociguat (Adempas®, BAY 63-2521) wurde beginnend ab postoperativem Tag 21 täglich oral verabreicht. Hierfür wurden die Mäuse der mit Riociguat behandelten Gruppen (TAC<sub>/RIO</sub>, Sham<sub>/RIO</sub>) in einer Gesamtdosierung von 3 mg/kg Körpergewicht in insgesamt 200 µl Lösungsmittel (Transcutol®/Cremophor®/Wasser: 10/20/70%) geschlündelt. Kontrolltiere erhielten täglich 200 µl des Lösungsmittels ohne Medikament (TAC<sub>/LM</sub>, Sham<sub>/LM</sub>). Die Tiere wurden randomisiert unter Verblindung und Planung durch K. Grube in die Behandlungsgruppen eingeteilt.



### 3.1.3 Kleintierechokardiographie

Zur Erfassung der kardialen Anatomie und Funktion wurde das bildgebende Verfahren der Kleintierechokardiographie unter Durchführung von K. Grube genutzt. Für die Bestimmung der kardialen Funktionsparameter wurde das Vevo® 2100 System verwendet und die Tiere transthorakal echokardiographisch, mit Aufzeichnung von Herzfrequenz und Körpertemperatur untersucht. Die Ultraschallmessungen erfolgten erstmals direkt vor der OP und anschließend im wöchentlichen Rhythmus bis zum Ende der Studie nach insgesamt 8 Wochen. Die Mess- und Auswerteprozedur stellte sich wie folgt dar.

Die narkotisierte Maus (Induktion bei 3% Isofluran in Raumluft, Aufrechterhaltung mittels Beatmungsmaske bei 1,5 - 1,8% Isofluran) wurde auf dem zum Vevo® 2100 System zugehörigen *Mouse Handling Table* in Rückenlage positioniert, fixiert und der Brustbereich enthaart (Depilationscreme). Dieser Tisch besteht aus einer, über ein Kugelgelenk verstellbaren Plattform mit integrierter Wärmeplatte und integrierten EKG-Elektrodenplättchen zur gleichzeitigen Ableitung eines 1-Kanal-EKGs während der echokardiographischen Untersuchung. Über eine Rektalsonde konnte die Temperatur überwacht und mittels Wärmeplatte und zusätzlicher Rotlichtlampe kontrolliert werden. Der Brustkorb wurde nun mit angewärmtem Ultraschallgel ca. einen Zentimeter dick bedeckt.

Als erstes wurde nun die Ebene im B-Modus (*Brightness Mode*) eingestellt, in der man den Aortenbogen erkennen konnte (*Aortic Arch View*). Dazu musste der Tisch vollständig nach rechts gekippt werden, sodass sich die Maus in maximal linker Seitenlage befand. Der Schallkopf (MicroScan™ MS400, 18-38 MHz) wurde nun in einem Winkel von ca. 30° in Längsachse auf das Gelkissen aufgesetzt und leicht im Uhrzeigersinn gedreht bis der Aortenbogen deutlich mit seinen drei Abgängen zu sehen war. Auf Höhe der Stenose wurde dann mittels PW-Doppler (*Pulsed Wave*) die maximale Flussgeschwindigkeit gemessen. Die Ligatur galt als bestätigt und valide bei einem Aortenfluss von  $\geq 4000$  mm/s in den TAC-Tieren.

Zur Darstellung der parasternalen kurzen Achse (PSAX) wurde der Schallkopf um 90° im Uhrzeigersinn ausgehend von der parasternalen Längsachsenansicht (PLAX) gedreht. Um Übersicht zu erlangen, wurde wieder im B-Modus die gewünschte Ebene eingestellt, diesmal mittig auf Höhe der Papillarmuskeln. Im M-Modus (*Motion Mode*) konnten nun die Messungen der funktionellen Parameter durchgeführt werden.

Die Bilddaten wurden vom Echokardiographiegerät auf eine externe Festplatte zur *offline* Analyse kopiert. Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte geblindet mittels Vevo® LAB Software (ver. 3.0.0) von VisualSonics®. Alle Messungen und Berechnungen wurden gemäß der VisualSonics® Richtlinien und Anwendungshinweisen zur Benutzung des Vevo® 2100 Systems (*Guide to Small Animal Echocardiography, Application Note Cardiac Measurements ver1.0*) durchgeführt. Eine Übersicht der berechneten Parameter ist in Tabelle 3.1 aufgeführt.

**Tabelle 3.1: Berechnung funktioneller Parameter aus echokardiographischen Daten.** IVS;d: interventrikuläres Septum, enddiastolisch, LVID;d bzw. LVID;s: linksventrikulärer innerer Durchmesser, enddiastolisch bzw. endsystolisch, LVPW;d bzw. LVPW;s: linksventrikuläre Hinterwanddicke, enddiastolisch bzw. endsystolisch, o.D.: ohne Dimension

Parameter	Abkürzung	Formel	Einheit
Linksventrikuläre Masse	LVM	$1,053 * [(LVID;d + LVPW;d + IVS;d)^3 - LVID;d^3]$	mg
Verhältnis von linksventrikulärer Masse zu Körpergewicht	LVM/BW Ratio	LVM/BW	o.D.
Linksventrikuläres Volumen (Diastole)	LVEDV	$[7,0 / (2,4 + LVID;d)] * LVID;d^3$	μl
Linksventrikuläres Volumen (Systole)	LVESV	$[7,0 / (2,4 + LVID;s)] * LVID;s^3$	μl
Linksventrikuläre Verkürzungsfraktion	LVFS	$100 * [(LVID;d - LVID;s) / LVID;d]$	%
Linksventrikuläre Ejektionsfraktion	LVEF	$100 * [(LVEDV - LVESV) / LVEDV]$	%

Nach der Untersuchung wurde die Isofluraninhalationsnarkose heruntergeregelt, die Fixation der Maus gelöst und das Ultraschallgel sorgfältig entfernt. Bis zum Aufwachen und der vollständigen Erholung von der Narkose wurden die Tiere wieder in einem separaten Käfig unter Rotlicht nachbeobachtet.

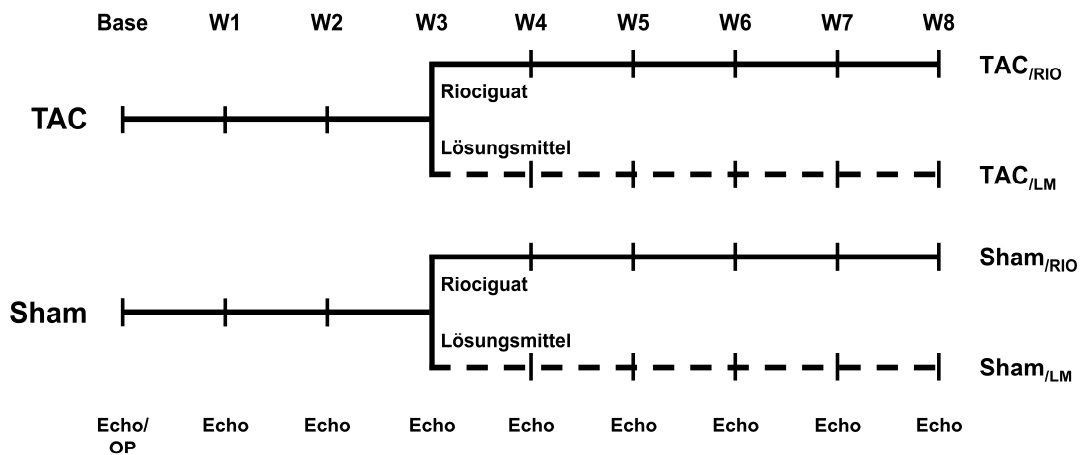
Für die statistische Auswertung der kardialen Funktionsparameter wurde die Software *GraphPad Prism 5* verwendet. Es erfolgte eine zweifache Varianzanalyse (*two-way ANOVA*) mit Bonferroni-Korrektur, um die Alphafehler-Kumulierung zu korrigieren. P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant bewertet.

### 3.1.4 Versuchsaufbau und Studiendesign

Zur Beantwortung der Fragestellung wurde das in der Arbeitsgruppe etablierte TAC-Model verwendet, welches den Verlauf der Erkrankung vom gesunden Herzen über eine kompensierte

Herzhypertrophie bis hin zur dekompenzierten HI in der Maus innerhalb von 8 Wochen (56 Tagen) abbildet [119].

Acht Wochen alte, männliche C57BL/6N Mäuse erhielten zu Versuchsbeginn eine initiale Baseline-Echokardiographie und wurden anschließend entweder einer TAC- oder Sham-Operation unterzogen. Nach drei Wochen (W3), als sich bereits eine messbare Hypertrophie etabliert hatte, wurden die Tiere randomisiert den vier verschiedenen Behandlungsgruppen zugeordnet (TAC<sub>/LM</sub>, TAC<sub>/RIO</sub>, Sham<sub>/LM</sub>, Sham<sub>/RIO</sub>). Die Behandlung erfolgte für fünf weitere Wochen mit Riociguat (RIO) bzw. Lösungsmittel (LM). Am Ende des Versuchszeitraumes, nach insgesamt acht Wochen (W8), wurden die Tiere der vier verschiedenen Behandlungsgruppen sakrifiziert und die entnommenen Herzen weiterfolgenden Analysen zugeführt. Zur Verdeutlichung ist in Abbildung 3.2 der Versuchsaufbau schematisch dargestellt.



**Abb. 3.2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.** Nach initialer Baseline-Echokardiographie wurden die Tiere entweder TAC oder Sham operiert. Behandlungsbeginn erfolgte 3 Wochen post-OP, als eine Hypertrophie nach TAC bereits etabliert war. Die Behandlungsdauer umfasste weitere 5 Wochen. Am Ende des Versuchszeitraumes nach insgesamt 8 Wochen wurden die Herzen entnommen und weiterführenden Analysen zugeführt. Eine echokardiographische Evaluierung der Herzfunktion erfolgte wöchentlich zu den angegebenen Zeitpunkten. (Base: Baseline, acht Wochen alte, männliche C57BL/6N Mäuse; W1-8: Wochenverlauf post-OP)

### 3.1.5 Euthanasie und Organentnahme

Die Versuchstiere wurden zum primären Endpunkt, 8 Wochen nach OP (Tag 56), direkt nach der Echokardiographie euthanasiert. Dazu wurde die Maus mit 2,5%iger Thiopental-Natrium-Lösung (100 µl, i.p.) sediert, Brust- und Bauchraum chirurgisch eröffnet und das Herz über die abdominale Aorta mit eiskaltem PBS blutleer gespült und entnommen. Die präparierten linken Ventrikel (ohne Septum) wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C für weitere Analysen

aufbewahrt. Ergänzend wurden Herzen randomisiert für histologische Analysen ausgewählt und unter Anleitung von K. Grube und von Brita Püschel oder Lucy Dietzsch, Klinik für Innere Medizin B, Universitätsmedizin Greifswald, eine Gewebescheibe aus der Herzmitte heraus präpariert und entsprechend der jeweiligen histologischen Methode weggefroren oder fixiert, eingebettet, gefärbt und aufbewahrt (s. Abschnitt 3.2).

## **3.2 Histologische Analysen**

### **3.2.1 Pikro-Siriusrot-Färbung**

Die Pikro-Siriusrot-Färbung ist eine gängige Methode in der Histologie, um Kollagen in Gewebeschnitten anzufärben, die fixiert und in Paraffin eingebettet sind [120]. Betrachtet man gefärbte Präparate unter dem Lichtmikroskop so erscheint Kollagen rot und das restliche Gewebe gelblich. Diese Färbemethode ermöglicht dadurch, die Fibrosierung von z.B. Herzgewebe quantitativ zu bestimmen [121, 122].

Die herauspräparierten Gewebsscheiben aus der Herzmitte wurden in 4% Formaldehydlösung fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet (STP120 Gewebeeinbettautomat, HistoStar™). Von den eingebetteten Präparaten wurden nun axial zur Herzmitte 5 µm dicke Schnitte am Rotationsmikrotom angefertigt, auf Objektträger gezogen, gestreckt und bei 70°C im Trockenschrank für 30 min getrocknet. Als nächstes wurden die Schnitte mit Xylol entparaffiniert (2x10 min), über eine absteigende Ethanolreihe (100%, 96%, 80%, 70%) rehydriert, in A. dest gewaschen und für 60 min in 0,1% Pikro-Siriusrot-Lösung gefärbt. Anschließend wurden die Präparate in 1% Essigsäure gewaschen (2x5 min), über eine aufsteigende Ethanolreihe wieder dehydriert (70%, 96%, 100%), in Xylol eingestellt und in Entellan® eingedeckt.

### **3.2.2 Dystrophin-Immunfärbung**

Die immunhistochemische Markierung von Dystrophin mittels fluorochromierter Antikörper ermöglicht es, in kardialen Kryoschnitten die Membran von Kardiomyozyten sichtbar zu machen und anhand fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen deren Größe zu quantifizieren und Rückschlüsse auf eventuelle Größenveränderungen zu ziehen [123, 124]. Dystrophin eignet sich hierbei als Zielantigen, da es muskelzellspezifisch im Sarkolemm vorkommt [125]. Das in dieser Studie genutzte Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz basiert auf der Verwendung unmodifizierter Primärantikörper, die in einem zweiten Schritt von Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern

visualisiert werden, wobei diese fluorchromierten Antikörper gegen die Wirtsspezies des Primärantikörpers gerichtet sind. Sowohl Blockierlösung als auch Antikörperverdünnungen sollten dabei stets das Serum aus der Wirtsspezies des Zweitantikörpers enthalten, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern [126].

Zuerst mussten die gefrorenen Gewebe in einem Kryostat (CryoStar™ NX50) für 30 min equilibrieren (Kammertemperatur: -20°C, Objektkopftemperatur: -16°C) bevor sie in Kryoeinbettmedium (Tissue-Tek® O.C.T.™) aufgenommen wurden. Wieder axial zur Herzmitte wurden 6 µm dicke Kryoschnitte angefertigt, auf Objektträger gezogen, dann 5 min bei Raumtemperatur (RT) getrocknet, 10 min in eisgekühltem Aceton fixiert und anschließend 3x5 min mit PBS gewaschen. Nach zehnminütiger Permeabilisierung (0,1% Triton X® 100 in PBS) wurden die Präparate für 1 h in 5% Normal-Serum aus der Ziege in PBS blockiert. Der gegen Dystrophin gerichtete Primärantikörper (Sigma-Aldrich, #D8043) wurde 1:500 in 5% Serum verdünnt und die Schnitte über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 3x5 min Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit 1:200 in 5% Serum verdünntem fluorchromierten Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 488, Invitrogen, #A-11001) für 1 h im Dunkeln. Abschließend wurde erneut 3x5 min mit PBS gewaschen, die Zellkerne mit DAPI (1:1000 in PBS) angefärbt, nochmals 5 min mit PBS gewaschen und die Schnitte mit fluoreszenzerhaltendem Eindeckmedium bedeckt und bis zur Mikroskopie bei 4°C dunkel aufbewahrt.

### 3.2.3 Mikroskopie

Die Piko-Siriusrot gefärbten Schnitte wurden im Hellfeld mit 10facher Vergrößerung mikroskopiert (Keyence BZ-9000). Jeweils ein Querschnitt pro Herz von je 6-7 Herzen pro Gruppe wurde vollständig in gerasterten Einzelbildern aufgenommen und mittels integrierter BZ-II Analyzer Software zu einem Gesamtbild (*Single Macro Image*) zusammengefügt. Anschließend konnten die fibrotischen Areale durch den in die Analysesoftware integrierten pixelbasierten Algorithmus zur Farbbestimmung semi-automatisch im Verhältnis zur Gesamtfläche der Schnitte quantifiziert werden.

Die fluoreszenzgefärbten Schnitte wurden mit 20facher Vergrößerung, ebenfalls mit dem Keyence BZ-9000, mikroskopiert. Sowohl die einzelnen Fluoreszenzsignale von Kern- und Dystrophinfärbung als auch fusionierte Bilder beider Kanäle wurden aufgenommen. Pro Gruppe standen 6-7 Herzen zur Verfügung. Von jedem Herz wurden von zwei Querschnitten jeweils zwei Aufnahmen (entspricht 4 Aufnahmen/Herz) für die Auswertung verwendet. In jeder dieser Aufnahmen wurden dann wiederum 20 Myozyten ausgemessen. Mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogrammes *ImageJ* wurden dann die Querschnittsflächen von diesen insgesamt 80 einzelnen Kardiomyozyten pro Herz bestimmt.

Sowohl mikroskopische Aufnahmen als auch Messungen wurden geblindet durchgeführt. Für die statistische Auswertung erfolgte bei beiden histologischen Analysen eine einfache Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) mit Bonferroni Post-hoc-Test (*GraphPad Prism 5*).

### 3.3 Proteinbiochemische Analysen

#### 3.3.1 Proteinextraktion aus Herzgewebe

Die gefrorenen linken Ventrikel (60-100 mg) wurden zunächst unter stetiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff von Hand mittels Mikro-Pistill direkt in 2 ml Reaktionsgefäßen (*Tubes*) zu grobem Pulver zermahlen. Eine Hälfte wurde für die Proteinbiochemie verwendet, die andere für die Sequenzierungsanalysen (s. Abschnitt 3.4), und bis zur jeweiligen Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Die Proteinextraktion erfolgte mechanisch mittels Kugelmühle (Mikro-Dismembrator S) und anschließender Ultraschallhomogenisierung (SONOPULS HD 2200). Die Gewebepulver wurden hierfür zusammen mit 100 µl 1xUT Puffer (8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff; Tab. 3.2) in mit Stickstoff vorgekühlte Teflongefäße mit Wolframkugel-Inserts überführt und in der Kugelmühle für 2 min bei 2600 rpm aufgeschlossen. Die Proben wurden in einem Endvolumen von 1000 µl 1xUT aufgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Darauf folgte eine Behandlung mit Ultraschall für 3x5 Sekunden auf Eis (Zyklus 9) zur vollständigen Homogenisierung der Gewebelysate und Degradation der DNA. Zwischen den einzelnen Ultraschallschritten wurde mindestens 1 Minute pausiert, um ein zu starkes Erhitzen der Proben zu vermeiden. Nach anschließendem einstündigen Abzentrifugieren der Zelltrümmer bei 4°C und 13000 rpm (Heraeus™ Fresco™ 17) wurden die proteinhaltigen Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration bei -80°C gelagert.

**Tabelle 3.2: Zusammensetzung 1xUT.**

Chemikalien	Menge	Endkonzentration
Harnstoff	1,92 g	8 M
Thioharnstoff	0,61 g	2 M
A. dest	ad. 4 ml	

### 3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinquantifizierung wurde mittels photometrischer Methode nach BRADFORD (1976) bestimmt, welche auf der Komplexbildung des im Bradford-Reagenz enthaltenen Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau G-250 mit Aminosäureliganden in den Proteinen und einer damit verbundenen Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 auf 595 nm beruht [127].

Die Konzentrationsbestimmung der komplexen Proteingemische erfolgte in Triplikaten in 96-Well Mikrotiterplatten und gegen einen dem Probenpuffer entsprechenden 1xUT Blindwert. Ein definiertes Volumen der Probe oder einer Probenverdünnung wurde auf 160  $\mu\text{l}$  mit HPLC-Wasser aufgefüllt und 40  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz hinzugefügt. Die Messung wurde an einem VarioSkan™ Flash Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm durchgeführt und mittels SkanIt Software (ver 2.4.3) anhand einer Eichkurve mit bovinem Serumalbumin (BSA) in einem Bereich von 0-0,08  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  berechnet (Tab. 3.3).

**Tabelle 3.3: Eichreihe für die Proteinbestimmung nach Bradford.**

BSA-Konz. [mg/ml]	0	0,01	0,02	0,04	0,05	0,06	0,08
BSA-Stammlösung (0,1 mg/ml) [ $\mu\text{l}$ ]	0	20	40	80	100	120	160
HPLC-grade Wasser [ $\mu\text{l}$ ]	160	140	120	80	60	40	0
Bradford-Reagenz [ $\mu\text{l}$ ]	40	40	40	40	40	40	40

### 3.3.3 Probenaufbereitung für massenspektrometrische Analysen

#### 3.3.3.1 Flüssigverdau mit LysC und Trypsin

Für alle durchgeführten massenspektrometrischen Messungen (5-6 Mäuse pro Gruppe) wurden je 4  $\mu\text{g}$  Protein proteolytisch mit LysC und Trypsin verdaut. Alle dafür benötigten Lösungen sind in ihrer Zusammensetzung in Tabelle 3.4 aufgeführt. Zunächst mussten die Proben in 20 mM Ammoniumbicarbonat (ABC) verdünnt werden, da eine zu hohe Harnstoffkonzentration die Aktivität der Proteasen inhibiert. Dazu wurde die entsprechende Menge Protein auf 10  $\mu\text{l}$  mit ABC aufgefüllt. Im nächsten Schritt wurden die Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen der Proteine durch Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  25 mM DTT-Lösung (Endkonzentration 2,5 mM DTT) durch einstündiges Inkubieren bei 60°C reduziert, die Proben anschließend auf 18  $\mu\text{l}$  mit 20 mM ABC aufgefüllt und mit 2  $\mu\text{l}$  Iodacetamidlösung (Endkonzentration 10 mM IAA) bei 37°C für 30 min im Dunkeln alkyliert, um die Reoxidation der Thiolgruppen zu verhindern.

Um eine möglichst hohe Zahl an Peptiden aus dem komplexen Gemisch an Herzproteinen zu erhalten, wurde vor dem eigentlichen Trypsinverdau ein 3 stündiger Vorverdau bei 37°C mit LysC, im Verhältnis 1:100 zur eingesetzten Proteinmenge durchgeführt. Diese Serinprotease, isoliert aus dem Bakterium *Lysobacter enzymogenes*, spaltet spezifisch Peptidbindungen C-terminal an Lysin. Anschließend wurde den Proben Trypsin (Protease zu Protein Verhältnis 1:10) zugesetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Spaltung der Proteine durch Trypsin erfolgt durch Hydrolyse der Peptidbindungen C-terminal an Arginin und Lysin. Am Folgetag wurde der Verdau durch Zugabe von 5% Essigsäure (Endkonzentration 1%) abgestoppt.

**Tabelle 3.4: Zusammensetzung der Lösungen zur Probenvorbereitung für den tryptischen Verdau.**

Chemikalien	Menge/Volumen
<b>20 mM ABC</b>	
ABC	20 mg
HPLC-grade Wasser	12,5 ml
<b>25 mM DTT</b>	
DTT	30 mg
20 mM ABC	8 ml
<b>100 mM IAA</b>	
IAA	18 mg
20 mM ABC	1 ml

### 3.3.3.2 Entsalzung von Peptidlösungen an C18-Material

Nach dem tryptischen Verdau mussten die erhaltenen Peptidlösungen von Verunreinigungen befreit werden. Dazu wurden spezielle, mit C18-Material gepackte Spitzen (ZipTip®,  $\mu$ -C18 mit 2  $\mu$ g Kapazität) verwendet, mit denen die hydrophoben Peptide gebunden und hydrophile, niedermolekulare Bestandteile abgetrennt werden konnten. Danach erfolgte die Elution der Peptide.

Zur Equilibrierung wurden die Spitzen zunächst 3x mit 10  $\mu$ l 100% ACN benetzt, dann schrittweise nacheinander jeweils fünfmal mit 10  $\mu$ l 80% ACN in 1% Essigsäure, 50% ACN in 1% Essigsäure, 30% ACN in 1% Essigsäure und zweimal mit 1% Essigsäure (Tab. 3.5) gewaschen. Nun wurden die Peptide durch 15x Auf- und Abpipettieren an das Trägermaterial gebunden und Verunreinigungen anschließend durch fünfmaliges Waschen mit 1% Essigsäure entfernt. Es folgte die Elution in 5  $\mu$ l 50% ACN in 1% Essigsäure und 5  $\mu$ l 80% ACN in 1% Essigsäure. Beide Eluate wurden in einem



Microvial vereinigt, die Lösungsmittel mittels Gefriertrocknung verdampft und die Peptide abschließend in 20 µl Puffer A aufgenommen (Tab. 3.5).

**Tabelle 3.5: Zusammensetzung der Lösungen für die Reinigung von Peptidlösungen an C18-Material.**

<b>Chemikalien</b>	<b>Volumen</b>
<b>Equilibrierungslösungen</b>	
80% ACN in 1% Essigsäure	1200 µl 100% ACN 300 µl 5% Essigsäure
50% ACN in 1% Essigsäure	750 µl 100% ACN 450 µl <i>HPLC-grade</i> Wasser 300 µl 5% Essigsäure
30% ACN in 1% Essigsäure	450 µl 100% ACN 750 µl <i>HPLC-grade</i> Wasser 300 µl 5% Essigsäure
<b>Waschlösung (1% Essigsäure)</b>	1200 µl <i>HPLC-grade</i> Wasser 300 µl 5% Essigsäure
<b>Puffer A</b>	3,84 ml <i>HPLC-grade</i> Wasser
<b>(2% ACN; 0.1 % Essigsäure)</b>	80 µl 100% ACN 80 µl 5% Essigsäure

### 3.3.4 Proteomanalyse mittels LC-ESI MS/MS

Die Peptidanalyse erfolgte mittels Flüssigkeitschromatographie (LC) Elektrosprayionisation (ESI) Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) an einem nanoACQUITY UPLC® System, gekoppelt an ein LTQ-Orbitrap Velos™ Massenspektrometer mit nano-ESI-Quelle und PicoTip® Emitter. Die Messungen wurden von Dr. Vishnu M. Dhople durchgeführt.

Die Injektionsmenge betrug jeweils 400 ng. Nach Peptidbindung an eine Vorsäule (nanoACQUITY UPLC 2G Trap Column, 2 cm Länge, 180 µm i.D., 5 µm Partikelgröße) erfolgte die LC-Auftrennung der Peptide über eine analytische Säule (nanoACQUITY BEH130, 10 cm Länge, 100 µm i.D., 1,7 µm Partikelgröße) an C18-Umkehrphasenmaterial über einen nichtlinearen Gradienten von polarem (Puffer A: 2% ACN in 0,1% Essigsäure) und unpolarem Lösungsmittel (Puffer B: 100% ACN in 0,1% Essigsäure) bei einer konstanten Flussrate von 400 nl/min (Tab. 3.6).

**Tabelle 3.6: Parameter zur Auftrennung von Peptidgemischen an der nanoACQUITY UPLC®.**

<b>Gradient</b>	
<b>Zeit (min)</b>	<b>Konzentration Puffer B (%)</b>
0	1
2	5
65	25
90	60
91	99
92	1
<b>Flussrate</b>	400 nl/min

Die eluierenden Peptide wurden anschließend im datenabhängigen Modus (DDA, *Data-Dependent Acquisition*) des LTQ-Orbitrap Velos™ Massenspektrometers detektiert. Nach einem Übersichtsscan im Massenbereich von  $m/z$  300 – 1700 (Auflösung  $R = 30000$ ,  $1 \times 10^6$  Ionen) wurden pro Zyklus die 20 Vorläufer-Ionen (Präkursoren) mit den höchsten Intensitäten für eine Fragmentierung mittels CID (*Collision-Induced Dissociation*) ausgewählt. Dabei wechselt die Datenerfassung automatisch zwischen Orbitrap-MS und LTQ-MS/MS Scans. Für die Fragmentierung wurde eine Isolationsweite von 2 Da und als Zielwert die Zahl von  $1 \times 10^4$  Ionen bzw. eine maximale Sammelzeit für die Ionen von 100 ms gesetzt. Der Grenzwert für die Ionenauswahl für die Fragmentierung betrug 2000 *counts* bei einer Aktivierungszeit von 10 ms und einer normalisierten Kollisionsenergie von 35%. Es wurden nur doppelt und dreifach geladene Ionen isoliert und die Ausschlusszeit auf 60 s gesetzt, um die Fragmentierung bereits gemessener Präkursoren zu minimieren.

### 3.3.5 Datenauswertung

Die Auswertung bzw. Verarbeitung der massenspektrometrischen Rohdaten (\*.RAW-Dateien) erfolgte mittels MaxQuant Software (ver. 1.5.3.8). Die MS/MS-Spektren wurden mit der in MaxQuant integrierten Andromeda Suchmaschine gegen die murinen Einträge einer UniProt/Swiss-Prot Datenbank (rel. 22/02/2017) abgeglichen [128]. Zusätzlich wurde eine weitere Datenbank genutzt, um Kontaminationen wie humane Keratine, die eventuell beim Bearbeiten der Proben eingebracht wurden, und die Proteasen Trypsin und LysC zu exkludieren. Um die Datenbanksuchparameter besser anzupassen, wurde die Software Preview™ genutzt. Preview™ führt dabei eine schnelle Analyse anhand der 100 Proteine mit der höchsten Abundanz in einer Probe durch, um die optimalen Einstellungen für eine vollständige Datenbanksuche zu bestimmen. Dies schließt Verdauspezifität (z.B. voll-tryptisch oder semi-tryptisch), Präkursorenmassentoleranz, Fragmentmassentoleranz,

Cysteinalkylierung und signifikante variable Modifikationen (z.B. Oxidation, Deamidierung) mit ein [129]. Die Parameter für eine vollständige Datenbanksuche sind in Tabelle 3.7 gelistet.

Die Identifizierung von Peptiden und Proteinen erfolgte jeweils nur bis zu einer FDR (*False Discovery Rate*) von 1% und einer Peptidmindestlänge von 6 Aminosäuren. Um die Anzahl an Peptiden für die Quantifizierung zu erhöhen, wurde das *match-between-runs* Zeitfenster auf 0,7 min und das Ausrichtungszeitfenster für die Retentionszeiten auf 20 min gesetzt. Mit Hilfe eines softwareeigenen Algorithmus zur markierungsfreien Quantifizierung wurden LFQ (*Label-Free Quantification*) Intensitäten berechnet, normalisiert und extrahiert [130].

Alle weiteren Einstellungen wurden auf den empfohlenen Standardsettings von MaxQuant belassen [131].

**Tabelle 3.7: Parameter für die Identifizierung und Quantifizierung von Peptiden/Proteinen mittels MaxQuant.**

Parameter	Einstellung
<b>Datenbank</b>	Uniprot/Swiss-Prot rel. 22/02/2017 limitiert auf das Taxon <i>Mus musculus</i> (forward)
<b>Enzyme</b>	Trypsin, LysC
<b>Max. Fehlsplaltungen (<i>Missed Cleavages</i>)</b>	2
<b>Präkursorintoleranz</b>	20 ppm
<b>Fragmenttoleranz</b>	0,6 Da
<b>Falsch-Positiv Rate (FDR)</b>	
Peptidebene	1% (Target-Decoy Ansatz)
Proteinebene	1% (Target-Decoy Ansatz)
<b>Decoy-Modus</b>	revers
<b>Statische Modifikationen</b>	Carbamidomethylierung (C; +57,0125 Da)
<b>Variable Modifikationen</b>	Oxidation (M; +15,9949 Da) Acetylierung (Protein N-term, +42,0107 Da) Glu → Pyro-Glu Konversion (aus E, -18,0107 Da) Gln → Pyro-Glu Konversion (aus Q, -17,0265 Da)
<b>Quantifizierung</b>	<i>Label-Free</i> (LFQ)
<b>Peptide für Quantifizierung</b>	<i>unique + razor</i>
<b>Mindestpeptidanzahl</b>	1

Eine relative Quantifizierung erfolgte mittels Genedata Analyst™ (ver. 10.0.3). Normalisierte Intensitäten aus MaxQuant wurden  $\log_{10}$  transformiert und unterschiedlich abundante Proteine zwischen den verschiedenen Vergleichsgruppen via Welch's *t*-Test identifiziert. Eine Quantifizierung

erfolgte nur bei Proteinen mit mind. 50% gültigen Messwerten pro Gruppe. Proteine mit einem p-Wert  $< 0,05$ , einem *Fold Change* (FC)  $\geq |1,3|$  und identifiziert mit mind. 2 Peptiden wurden als signifikant in ihrer Abundanz verändert angesehen. Um ebenfalls eine Aussage über die nicht quantifizierbaren Proteine ( $< 50\%$  gültige Messwerte) zu erhalten, z.B. ob diese eventuell krankheitsbedingt in der einen Gruppe vorhanden sind und in der anderen nicht bzw. umgekehrt, wurde im Analyst™ eine *absent/present* Suche durchgeführt. Die Aussagekraft wurde dabei anhand der obligatorischen statistischen Testverfahren innerhalb der Genedata *absent/present* Analyseroutine bewertet. Als signifikant vorhanden bzw. abwesend galten Proteine mit  $p < 0,05$  und identifiziert mit  $\geq 2$  Peptiden. Alle massenspektrometrischen Proteomdaten sind über das *ProteomeXchange Consortium* und die PRIDE (*Proteomics IDentifications*) Datenbank verfügbar (Datensatz-ID: PXD024156).

### 3.3.6 Funktionelle Klassifizierung

Für die funktionelle Einordnung und Analyse der Proteine mit signifikanten Unterschieden aufgrund der Aortenkonstriktion einerseits und die Auswirkung der Medikation auf das Proteom TAC- und Sham-operierter Mäuse andererseits wurde die Software Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) genutzt. Bei der Auswertung der Daten wurden die wichtigsten betroffenen biologischen Funktionen und deren kanonische Interaktionsschemata berücksichtigt, besonders im Hinblick auf kardiovaskuläre Erkrankungen. Die Signifikanzen der überrepräsentierten funktionellen Kategorien wurden hierbei mittels Fisher's Exact Test bestimmt. Um die Ausrichtung der betroffenen biologischen Prozesse zu bewerten und zu identifizieren, wurden außerdem *Downstream Effects* Analysen (DEA) durchgeführt. IPA®'s *z-score* Algorithmus ermittelt dabei Werte, deren Vorzeichen die Richtung der Veränderung angeben. *Z-Scores*  $\geq 2$  oder  $\leq -2$  werden dabei als signifikant bewertet, wobei  $z \geq 2$  eine Aktivierung und  $z \leq -2$  eine Inhibierung der entsprechenden Stoffwechselwege bzw. biologischen Prozesse verdeutlicht [132]. Eine Zuordnung der zellulären Lokalisation identifizierter Proteine erfolgte mittels IPA®- (Ingenuity® Knowledge Base) und UniProt-Datenbanken (Universal Protein Resource Knowledgebase).

### 3.3.7 Eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1D-PAGE)

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld wurden TGX (*Tris-Glycine eXtended*) Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kits (Bio-Rad) nach Anweisung des Herstellers verwendet. Dieses Gelsystem beruht auf dem Prinzip der diskontinuierlichen SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach

Lämmli von 1970. Durch eine unterschiedlich konzentrierte Acrylamidmatrix und einen unterschiedlichen pH-Wert zwischen Sammel- und Trenngel entsteht dabei ein Stapelungseffekt an den Gelgrenzen, wodurch eine gute Trennung der Proteine ermöglicht wird. Des Weiteren denaturiert zugesetztes SDS als anionisches Detergens die Proteine und führt gleichzeitig zur Bildung negativ geladener SDS-Protein-Komplexe mit konstantem Ladung-zu-Masse-Verhältnis. Diese Komplexe wandern im elektrischen Feld zur Anode, wobei die Migrationsgeschwindigkeit in der Gelmatrix nur durch die Kettenlänge, proportional zur Molekülmasse, bestimmt wird [133]. Neben dem geringen Zeitaufwand für das Gelgießen (Polymerisation von Trenn- und Sammelgel in 30 min) und die Elektrophorese (Proteinseparation  $\leq 20$  min) besteht die Besonderheit der verwendeten Kits in der sogenannten Stain-Free™ Technologie. Diese ermöglicht die Detektion von Proteinen sowohl im Gel als auch nach einem Western Blot auf der Membran ohne zusätzliche Farbstoffe, Färbe- und Entfärbeschritte. Ein Trihalo-Komplex bindet hierbei kovalent an Tryptophan. Die Eigenfluoreszenz dieser Aminosäure nach Anregung unter UV-Licht wird dadurch massiv verstärkt, was eine Detektion von Proteinen im Bereich von 20-50 ng ermöglicht. Stain-Free™ Gele beinhalten diese Trihalo-Verbindung in ihrer Gelrezeptur und werden mit Standardreagenzien und -protokollen gefahren wie bei jedem anderen Gel, das für die SDS-PAGE genutzt wird [134-136].

Die Methode der SDS-PAGE wurde als Grundlage für die Western Blot Validierung der Ergebnisse aus den massenspektrometrischen Analysen verwendet (s. Abschnitt 3.3.8). Aufgetragen wurden jeweils 50  $\mu\text{g}$  Protein aus den linken Ventrikeln der verschiedenen Behandlungsgruppen. Ein Pool aus Proteinextrakten der gesunden Kontrollgruppe (Sham<sub>LM</sub>) wurde als Normalisierungsstandard auf jedem Gel mitgeführt, um aufgrund der hohen Probenzahl einen Vergleich zwischen verschiedenen Membranen zu ermöglichen. Als Marker wurden 5-10  $\mu\text{l}$  Precision Plus Protein™ Unstained Standard (1:30 in Laemmli-Probenpuffer verdünnt) verwendet. Vor der Elektrophorese wurden die Proben mit 2x Laemmli Probenpuffer (Bio-Rad) im Verhältnis 1:2 vermischt und 5 min bei 95°C im Thermomixer inkubiert. Die Separation erfolgte in mit 1x Laufpuffer gefüllten Mini-PROTEAN® Tetra Elektrophoresekammern bei konstanten 300 V (PowerPac 300 Basic) für 18-25 min, abhängig von der Acrylamidkonzentration der Gele. Zur Auftrennung wurden 7,5%, 10% oder 12% Acrylamid-Trenngele verwendet, je nach entsprechender Größe der zu detektierenden Proteine. Die Rezeptur von 2x Laemmli und Laufpuffer ist in nachfolgender Tabelle 3.8 gelistet. Nach erfolgreicher Elektrophorese wurden die Gele für eine Minute im ChemiDoc™ unter UV-Licht aktiviert und eine Stain-Free™ Aufnahme mit automatischer Belichtungszeit gemacht.

**Tabelle 3.8: Zusammensetzung der benötigten Puffer für die SDS-PAGE.**

Chemikalien	Menge/Volumen	Endkonzentration
<b>2x Laemmli-Probenpuffer (Bio-Rad, #161-0737)</b>	<b>30 ml</b>	
Tris-HCl, pH 6,8		65,8 mM
Glycerin (w/v)		26,3%
SDS		2,1%
Bromphenolblau		0,01%
β-Mercaptoethanol		5%
<b>10x Laufpuffer</b>		
Tris	30,3 g	250 mM
Glycin	144 g	1,9 M
SDS	10 g	0,1%
A. dest	ad. 1 l	
<b>1x Laufpuffer</b>		
10x Laufpuffer	1 l	10%
A. dest	ad. 10 l	

### 3.3.8 Western Blot und Detektion

Direkt im Anschluss an die 1D-PAGE erfolgte die Übertragung der aufgetrennten Proteine aus der Gelmatrix auf eine Nitrocellulosemembran mittels Western Blot (Trans-Blot® Turbo™ RTA Transfer Kit) nach Anweisung des Herstellers (Bio-Rad). Durch ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel angelegtes elektrisches Feld werden die Proteine in Richtung Anode aus dem Gel heraus auf die hydrophobe Membran transferiert und immobilisiert. Anschließend lassen sich gezielt Proteine durch spezifische Antikörper detektieren [137]. Die zuvor erwähnte Stain-Free™ Technologie (Abschnitt 3.3.7) ermöglicht nach erfolgtem Western Blot sowohl eine schnelle und einfache Überprüfung der Transfereffizienz/-effektivität und Qualitätskontrolle, als auch eine Normalisierung auf Gesamtprotein. Weder fehleranfällige Strippingprozeduren mit erneuter Untersuchung von *Housekeeping*-Proteinen wie GAPDH, noch aufwändige Färbemethoden wie Coomassie-, Tinten- oder Ponceau S Färbung sind dadurch notwendig. Des Weiteren sind die Modifikationen an den Proteinen (Trihalo-Komplex an Tryptophanen) durch diese Methode minimal und stören weder die Übertragung auf die Membran oder Immundetektion, noch imitiert diese Veränderung mögliche bzw.

vorhandene post-translationale Modifikationen, was zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse führen könnte [138-140].

Der elektrophoretische Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran erfolgte mit Hilfe eines *Semi-Dry* Blotters (Trans-Blot® SD) bei 15 Volt für 15 min (PowerPac 200 HC). Benötigte Filterpapiere, Membranen und Transferpuffer waren im verwendeten Kit enthalten. Membran, Gel und Filterpapier wurden vor Verwendung kurz in 4°C gekühltem Transferpuffer equilibriert und anschließend luftblasenfrei zu einem sogenannten Blot-Sandwich angeordnet. Nach der Übertragung wurden sowohl Gel als auch Membran kurz in A. dest gewaschen (1 min), um überschüssigen Puffer zu entfernen. Anschließend erfolgte eine Stain-Free™ Aufnahme des Gels mit der gleichen Belichtungszeit wie zuvor, direkt nach der SDS-PAGE, um die Blot-Effizienz zu bewerten. Die Membran wurde hingegen mit automatischer Belichtungszeit aufgenommen, um ein bestmögliches Bild zu erhalten. Dieses diente zur Überprüfung der Qualität des Western Blots und wurde später für die Normalisierung auf Gesamtprotein verwendet. Membranen mit schlechter Übertragung oder Luftblaseneinschlüssen wurden verworfen. Vor der weiteren Verwendung wurde die Membran für 5 min in 1x TBS-T geschwenkt (Tab. 3.9). Zur Blockierung unspezifischer, freier Bindungsstellen wurde die Membran in 3% BSA (in 1x TBS-T) für 1 h bei RT und 20 rpm auf einem Wippschüttler inkubiert. Zusätzlich wurde Avidin (50 µg/ml) der Blockierlösung hinzugefügt, um das Biotin biotinylierter Proteine zu maskieren. Da bei der späteren Detektion des *Strep*-tag gekoppelten Markers StrepTactin konjugierte Meerrettichperoxidase (HRP, *Horseradish Peroxidase*) verwendet wurde und StrepTactin ebenfalls Biotin bindet, wurden somit störende Hintergrundsignale vermieden [141]. Nach dem Blockierungsschritt wurde die Membran kurz in TBST-T gespült und über Nacht bei 4°C und 20 rpm auf dem Wippschüttler mit dem jeweiligen Primärantikörper in 1% BSA (in 1x TBS-T) inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran 3x 5 min in 1x TBS-T gewaschen und 1 h bei RT in HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper und StrepTactin-HRP Konjugat (1:10000 in 1x TBS-T) geschwenkt. Anschließend folgte erneut dreimaliges Waschen für 5 min in 1x TBS-T. Alle verwendeten Antikörper sind im Detail und mit ihren entsprechenden Verdünnungen in Abschnitt 2.5 dargestellt.

Die Chemilumineszenzdetektion erfolgte am ChemiDoc™ unter Verwendung des Clarity™ Western ECL Substrats von Bio-Rad nach Vorgabe des Herstellers. Hierbei wird Luminol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid durch die an den sekundären Antikörper gekoppelte HRP oxidiert, was zu detektierbarer Lichtemission (Lumineszenz) führt. Dokumentiert wurden jeweils Aufnahmen mit automatischer Belichtungszeit und die Signalakkumulation jede Sekunde bis zur Sättigung der

Bandenintensitäten. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ mit Hilfe des Programms ImageLab™ (ver. 6.0.1). Die Signalintensitäten der Proteinbanden wurden auf die Gesamtproteinintensität (Stain-Free™) der jeweiligen Probe normalisiert und ins Verhältnis zur mitgeführten Pool-Probe gesetzt. Die Validierungsergebnisse wurden mittels einseitigem Student's *t*-Test und Bonferroni-Holm-Korrektur getestet, während die Ergebnisse hinsichtlich des Phosphorylierungsstatus von Phospholamban mittels zweiseitigem Student's *t*-Test und Bonferroni-Holm-Korrektur getestet wurden. Alle *p*-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

**Tabelle 3.9: Zusammensetzung der benötigten Puffer für den Western Blot.**

Chemikalien	Menge/Volumen	Endkonzentration
<b>10x TBS (pH 7,4)</b>		
Tris	30 g	248 mM
NaCl	80 g	1,37 M
KCl	2 g	26,8 mM
A. dest	ad. 1 l	
<b>1x TBS-T</b>		
10x TBS	100 ml	10%
Tween 20	1 ml	0,1%
A. dest	ad. 1 l	

### 3.4 RNA- und microRNA-Sequenzierung

Bei der Sequenzierung von RNA und microRNA (RNA-Seq, miRNA-Seq) handelt es sich um ein Hochdurchsatzverfahren basierend auf der *Next-Generation-Sequencing*-Technologie (NGS) zur Bestimmung der Sequenzreihenfolge der vier Nukleobasen in Nukleinsäuren. Dies ermöglicht sowohl die Untersuchung gewebs- oder krankheitsspezifischer Expressionsmuster als auch die Entdeckung neuer, unbekannter RNA Spezies und microRNAs [142, 143]. Die Sequenzierung erfolgte in Kooperation mit dem *Institute of Human Genetics* des Helmholtz Zentrum München und wurde bis auf die Analyse der Roh-Sequenzdaten dort unter Leitung von Prof. Dr. Thomas Meitinger und Anleitung von Dr. Gertrud Eckstein durchgeführt. Aufgrund der erzeugten, sehr großen Datenmengen erfolgte die bioinformatische Auswertung der Ergebnisse sowie deren korrekte Bewertung in Zusammenarbeit mit Dr. Neetika Nath, Institut für Bioinformatik, Universität Greifswald.



### 3.4.1 RNA-Extraktion aus Herzgewebe

Wie in Abschnitt 3.3.1 bereits erwähnt, wurde die zweite Hälfte des Gewebepulvers aus gemörserten linken Ventrikeln für Sequenzierungsanalysen genutzt. Die RNA-Extraktion erfolgte wieder mechanisch mittels Kugelmühle (Mikro-Dismembrator S) in mit Flüssigstickstoff gekühlten Teflongefäßen mit Wolframkugel-Insert für 2 min bei 2600 rpm und in 100 µl QIAzol® (QIAGEN). Die Proben wurde in einem Endvolumen von 700 µl QIAzol® aufgenommen und in ein neues 2ml Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde mittels miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) gemäß Herstellerangaben isoliert. Die Qualitäts- und Konzentrationsbestimmung der RNA Extrakte erfolgte mit Hilfe des Agilent Bioanalyzer 2100 zusammen mit dem RNA 6000 Nano Kit gemäß des Eukaryote Total RNA Nano Series II Protokolls.

### 3.4.2 Probenvorbereitung und Sequenzierung

RNA-Seq, oder miRNA-Seq bezeichnen nicht im wörtlichen Sinne die Sequenzierung von RNA-Molekülen. Diese müssen zuvor durch reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden und können anschließend sequenziert werden [82]. Die für diese Arbeit angewandte Methode der Massen-Parallelsequenzierung beruht auf der *Sequencing-by-Synthesis* Technologie von Illumina®. Hierbei werden amplifizierte und mit Adaptoren versehene cDNA-Moleküle an die Oberfläche einer Durchflusszelle gebunden, in der später die Sequenzierung stattfindet. Die restliche Oberfläche ist mit Primern gesättigt, die komplementär zu den verwendeten Adaptoren sind. Durch die räumliche Nähe von DNA-Molekül und benachbartem Primer kommt es zu einem Brückenschlag der DNA-Fragmente und damit zur Bindung von Adapter und Primer. Eine anschließende isotherme Brückenamplifikation (*Bridge Amplification*) über mehrere Zyklen hinweg führt zur Generierung ganzer Cluster von identischen Fragmenten [144]. Nun folgt die eigentliche Sequenzierung über eine weiterentwickelte Kettenabbruch-Methode. An die DNA-Fragmente werden Sequenzierprimer gebunden und eine DNA-Polymerase baut anschließend fluoreszenzmarkierte Nukleotide entlang des Template-Strangs ein. Dabei stoppt die Elongation nach jedem eingebauten Nukleotid, da diese alle mit einem reversiblen Terminator an der 3'-OH-Gruppe versehen sind. Nach jedem Syntheseschritt können dadurch die entsprechend eingebauten Nukleotide innerhalb der Cluster durch deren Fluoreszenzsignal identifiziert werden. Die Schutzgruppe kann wieder entfernt werden und es folgen immer weitere Zyklen bis zu einer definierten Syntheselänge der DNA-Fragmente [145-147]. Durch die Verwendung von unterschiedlichen Adaptoren, die in ihrer

Basenreihenfolge an sechs Stellen verschieden sind (Index-Adapter-Sequenz), ist zusätzlich eine Multiplexsequenzierung mehrerer Proben gleichzeitig möglich [148, 149].

Jeweils 1 µg Gesamt-RNA pro Probe (n = 6 pro Gruppe) wurde für die Erstellung von mRNA-Sequenzbibliotheken verwendet. Die Konstruktion der Bibliotheken erfolgte automatisiert mittels Flüssigkeits-Handling Plattform Bravo (Agilent Technologies), als Multiplex und wie im Herstellerprotokoll für Hochdurchsatzsequenzierung TruSeq® *stranded mRNA Library Prep Workflow* beschrieben [148]. Eine qualitative und quantitative Kontrolle der generierten cDNA-Bibliotheken erfolgte unter Verwendung des LabChip® GX (PerkinElmer®) und des Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Invitrogen™). Die Sequenzierung erfolgte anschließend als Multiplex auf 7 Lanes als 100 bp *paired-end* Lauf in einem HiSeq® 4000 System (Illumina®).

Für die Konstruktion von microRNA-Sequenzbibliotheken wurde ebenfalls je 1 µg Gesamt-RNA pro Probe verwendet. Gemäß Herstellerangaben wurden mittels TruSeq® Small RNA Library Preparation Kit (Illumina®) Adapter an jedes Ende der RNA-Moleküle ligiert, dann revers transkribiert und amplifiziert, um cDNA-Bibliotheken zu generieren [149]. Dabei wurde für jede Probe eine andere Index-Adapter-Sequenz verwendet, um eine Multiplexsequenzierung zu ermöglichen. Nachdem die amplifizierte cDNA aller Proben äquimolar als 24-plex gepoolt wurde, erfolgte ein Gelaufreinigungsschritt unter Verwendung des Pippin Prep™ Systems (Sage Science) zur DNA-Größenselektion in 3% Agarose. Dabei wurden DNA-Fragmente im Bereich von 125-160 bp selektiert. Dieser Größenbereich entspricht den adapter-ligierten Konstrukten aus kleinen RNAs und vor allem microRNA. Nach erfolgter Qualitätskontrolle mittels Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies) und Quantifizierung mittels Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Invitrogen™) erfolgte die Sequenzierung in 100 bp langen *paired-end Reads* in einem HiSeq® 4000 System (Illumina®).

### 3.4.3 Datenauswertung

Die Analyse von RNA-Seq Daten stellt aufgrund der enormen Datenmengen, die dabei generiert werden, eine besonders große Herausforderung dar. Für die bioinformatische Analyse wurde zuerst die Datenqualität unter Verwendung der Software-Pakete Trimmomatic (ver. 0.35) und FastQC (ver. 0.11.9) bewertet. Hierbei wird ein Faktor herangezogen, der sogenannte Phred- oder Q-Score, der als Maß für die Qualität der identifizierten Nukleobasen bei automatisierter DNA-Sequenzierung dient. Trimmomatic beinhaltet zwei Hauptmodi, *paired-end mode* und *single-end mode*, wobei ersterer aufgrund der generierten *paired-end Reads* aus der Sequenzierung verwendet wurde.

Hierbei wird die Übereinstimmung der Lesepaare beibehalten und es werden zusätzliche Informationen gewonnen, um Adapter oder PCR-Primerfragmente, die während der Vorbereitung der Sequenzbibliotheken entstanden sind, besser zu identifizieren [150]. Nachdem die verschiedenen Illumina-spezifischen Adaptersequenzen entfernt wurden (ILLUMINACLIP), erfolgten Trimmsschritte zum Entfernen von Basen mit geringer Qualität bzw. einem Phred-Score unter 3 am Anfang (LEADING) und am Ende (TRAILING) der jeweiligen *Reads*. Ausgehend vom 5'-Ende wurde die Qualität der *Reads* innerhalb eines 4-Basen langen Leserahmens bewertet, der die gesamte Sequenz durchscant (SLIDINGWINDOW). Ein Trimmsschritt wurde innerhalb dieses Leserahmens durchgeführt, wenn die Durchschnittsqualität pro Base einen Phred-Score < 15 aufwies. Nachfolgende Tabelle 3.10 fasst alle wichtigen Programmbefehle, einschließlich Befehlszeile und Definition zusammen.

**Tabelle 3.10: Trimmsschritte innerhalb des Trimmomatic Software-Pakets.**

Nr.	Parameter	Beschreibung	Programmbefehl
1	ILLUMINACLIP	Entfernt Adapter und andere Illumina-spezifische Sequenzen vom <i>Read</i> .	(ILLUMINACLIP:Trimmomatic-0.35/adapters/TruSeq3-PE-2.fa:2:30:10:8:TRUE)* <b>oder:</b> (ILLUMINACLIP:Trimmomatic-0.35/adapters/smallrna.fa:2:30:10:8:TRUE)**
2	LEADING	Entfernt Basen vom Anfang eines <i>Reads</i> , wenn diese einen gewissen Qualitätsgrenzwert unterschreiten (Phred-Score < 3).	(LEADING:3)
3	TRAILING	Entfernt Basen vom Ende eines <i>Reads</i> , wenn diese einen gewissen Qualitätsgrenzwert unterschreiten (Phred-Score < 3).	(TRAILING:3)
4	SLIDINGWINDOW	Führt einen Trimmsschritt durch, wenn die Durchschnittsqualität innerhalb eines bestimmten Leserahmens (Länge von 4 Basen) einen gewissen Qualitätsgrenzwert unterschreitet (Phred-Score < 15).	(SLIDINGWINDOW:4:15)

\* für RNA-Seq

\*\* für miRNA-Seq

Anschließend wurden die *Reads* auf Sequenzähnlichkeiten zu bereits bekannten Sequenzen in öffentlich zugänglichen Datenbanken untersucht. Die Abgleichung bzw. das Alignment erfolgte gegen das murine Referenzgenom (mm10) mittels TopHat (ver. 2.1.1) [151]. Für Annotation und Expressionsanalysen wurden die in R verfügbaren Bioconductor Software-Pakete *AnnotationDbi* und *DESeq2* (ver. 1.32.0) verwendet [152, 153]. Der in *DESeq2* implementierte Wald-Test wurde für statistische Analysen genutzt, um die Signifikanz von Unterschieden zwischen zwei Bedingungen

festzustellen [154]. Anschließend wurde eine multiple Testkorrektur nach Benjamini-Hochberg durchgeführt, wobei die resultierenden adjustierten p-Werte (q-Werte) von 0,05 eine Falsch-Positiven-Rate von 5% implizieren. Eine Quantifizierung erfolgte nur bei Transkripten, die in mindestens 4 Proben pro Gruppe und mit jeweils mehr als 3 annotierten *Reads* identifiziert wurden. Alle RNA-Seq Rohdaten (FASTQ-Sequenzdateien) sind über das *Sequence Read Archive* (BioSample Accession: SAMN13337567) verfügbar.

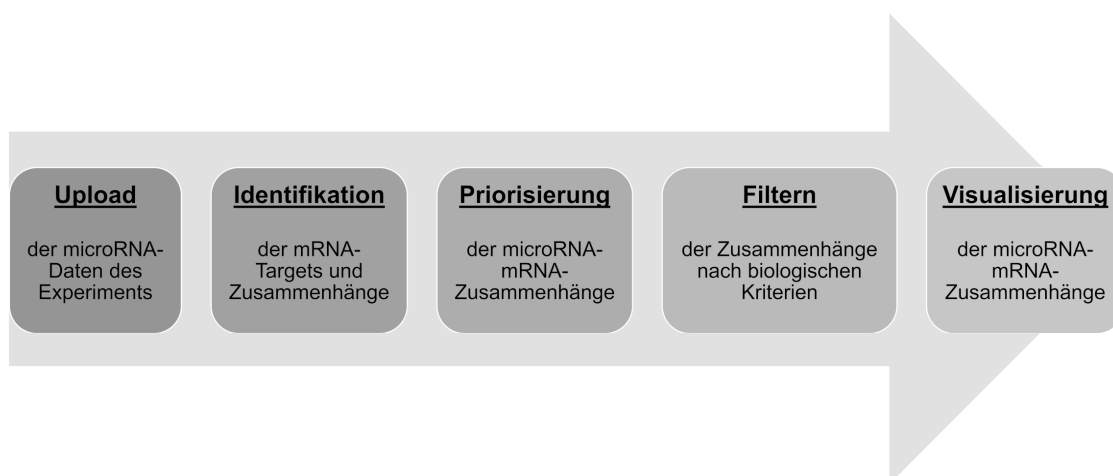
Die Auswertung der miRNA-Seq Daten erfolgte auf ähnliche Weise (Tab. 3.10). Nach erfolgtem Trimmen der Sequenzabschnitte (*Sequence Reads*) wurde für schnellere Berechnungen ein seqCollapse Schritt durchgeführt. Die Reduktion (*Collapsing*) von identischen *Reads* ist bei der Analyse von microRNAs dabei von Vorteil, da deren spezifische Länge deutlich geringer als die eigentliche Sequenzierungslänge ist, und verkürzt dadurch die benötigte Rechenzeit. Für Alignment und Annotation der microRNAs und Hairpin-Strukturen wurde das Software-Paket *miraligner* zusammen mit *bowtie* verwendet [155]. Als Referenzdatenbank für bekannte microRNAs diente miRBase (ver. 22.1) [156]. Expressionsanalysen wurden mittels *DEseq2* durchgeführt. Die verwendete Software ist via R-CRAN und Bioconductor verfügbar. Für statistische Analysen wurde ebenfalls der Wald-Test, wie bereits beschrieben, verwendet [154]. Berechnete p-Werte wurden nach Benjamini-Hochberg korrigiert und sind als q-Werte angegeben. Eine FDR von 5% wurde akzeptiert ( $q < 0,05$ ) und eine Quantifizierung erfolgte bei microRNAs, die in mindestens 4 Proben pro Gruppe und mit mehr als 3 annotierten Reads identifiziert wurden. Alle miRNA-Seq FASTQ-Dateien sind via *Sequence Read Archive* (BioSample Accession: SAMN17674846; BioProject: PRJNA697862) verfügbar.

### 3.4.4 Funktionelle Klassifizierung

Für die funktionelle Einordnung und Analyse der Transkripte mit signifikanten Unterschieden aufgrund der Aortenkonstriktion einerseits und die Auswirkung der Medikation auf das Transkriptom TAC- und Sham-operierter Mäuse andererseits wurde die Software Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) genutzt. Bei der Auswertung der Daten wurden die wichtigsten betroffenen biologischen Funktionen und deren kanonische Interaktionsschemata berücksichtigt, besonders im Hinblick auf kardiovaskuläre Erkrankungen. Die Signifikanzen der überrepräsentierten funktionellen Kategorien wurden hierbei mittels Fisher's Exact Test bestimmt. Um die Ausrichtung der betroffenen biologischen Prozesse zu bewerten und zu identifizieren, wurden außerdem *Downstream Effects* Analysen (DEA) durchgeführt. IPA®'s *z-score* Algorithmus ermittelt dabei

Werte, deren Vorzeichen die Richtung der Veränderung angeben. *Z-Scores*  $\geq 2$  oder  $\leq -2$  werden dabei als signifikant bewertet, wobei  $z \geq 2$  eine Aktivierung und  $z \leq -2$  eine Inhibierung der entsprechenden Stoffwechselwege bzw. biologischen Prozesse verdeutlicht [132].

Eine funktionelle Klassifizierung signifikant veränderter microRNAs erfolgte mittels *microRNA Pathway Dictionary Database* (miRPathDB v2.0, <https://mpd.bioinf.uni-sb.de/download.html>) basierend auf dem murinen Referenzgenom (rel. 15/07/2021) [157]. Dabei wurden Anreicherungsanalysen zu entsprechenden Signalwegen unter der Verwendung von GenTrail2 durchgeführt, wobei *Pathways* von der Datenbank KEGG und microRNA-Annotationen von miRBase herangezogen wurden [158]. Für jedes Paar aus microRNA und funktioneller Kategorie wurde ein hypergeometrischer Test angewendet, um die Signifikanz der microRNA-zu-*Pathway* Assoziation zu ermitteln. Die resultierenden p-Werte wurden adjustiert und ein Signifikanzniveau von  $FDR < 0,05$  akzeptiert. Des Weiteren wurden mittels eines in IPA® integrierten *Tools*, dem microRNA Target Filter, Zielgene bzw. mRNAs identifiziert (*Targets*), die eine Interaktion mit den gesuchten microRNAs aufzeigten. Abbildung 3.3 beschreibt den generellen *Workflow* solch einer microRNA Target Filter Analyse.



**Abb. 3.3: Workflow der microRNA Target Filter Analyse in IPA.** Dargestellt ist der typische Ablauf einer microRNA Target Filter Analyse mittels Ingenuity® Pathway Analysis Software (IPA®). Die Abbildung ist angelehnt an den englischen Original-Workflow von QIAGEN („*microRNA workflow in IPA*“, <https://digitalinsights.qiagen.com>)

Auf diese Weise sollten Einblicke in die biologischen Effekte der veränderten microRNAs gewonnen werden, wobei innerhalb IPA®'s Softwarearchitektur auf experimentell validierte Interaktionen publizierter Daten von TarBase, miRecords und der Ingenuity® Knowledge Base, sowie auf vorhergesagte microRNA-mRNA-Interaktionen von TargetScan zurückgegriffen wird. Potentielle microRNA-mRNA-Interaktionen wurden anhand des bereits vorhandenen, analysierten RNA-Seq

Datensatzes identifiziert und zugeordnet. Anschließend erfolgten funktionelle Analysen der entsprechenden mRNA-*Targets*, wie zuvor beschrieben. Aufgrund der vor allem inhibierenden Funktionsweise von microRNAs auf post-transkriptionaler Ebene wurden ebenfalls Proteom- und microRNA-Datensatz kombiniert. Eine negative Korrelation zwischen microRNA und *Target* sollte inhibitorische Effekte auf die Proteinsynthese entsprechender *Target*-mRNA identifizieren [159, 160].

### 3.4.5 Validierung der RNA-Seq Ergebnisse

Für die Validierung der RNA-Seq Daten wurde die Expression einiger ausgewählter Gene mittels nCounter® Plattform (NanoString Technologies®) untersucht. Dieses Analysesystem ermöglicht Multiplex-Genexpressionsanalysen von bis zu 96 Proben in einem Ansatz, wobei Expressionslevel von 12 bis 96 Zielgenen gleichzeitig erfasst werden können. Als Probenmaterial eignen sich hierbei aufgereinigte Gesamt-RNA von frischem, gefrorenem, oder Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe (FFPE), sowie Ganzzelllysate. Es erfordert weder eine reverse Transkription von mRNA zu cDNA, noch eine Amplifikation der resultierenden cDNA durch PCR. Die nCounter® Elements™ Technologie basiert auf der direkten digitalen Detektion von mRNA-Molekülen unter Verwendung zielgenspezifischer, farbcodierter Sondenpaare [161].

Die Durchführung erfolgte strikt nach Herstellerangaben (NanoString Technologies®) und ist deswegen nachfolgend nur kurz erklärt [162]. 100 ng isolierter RNA (miRNeasy Mini Kit, QIAGEN) der linken Ventrikel wurden für die Analysen eingesetzt. TagSets, bestehend aus fluoreszenzmarkierten spezifischen *Reporter*- und *Capture*-Tags (nCounter® Elements™, NanoString Technologies®), und zielgenspezifische Oligonukleotid-Sonden (Integrated DNA Technologies) wurden zusammen mit jeder Probe bei 67°C für 16 h über Nacht in einem Thermo-Cycler (Bio-Rad) mit beheizbarem Deckel hybridisiert. Die weitere Aufbereitung der auf 4°C heruntergekühlten Proben erfolgte automatisiert in der Prep-Station (NanoString Technologies®) und die anschließende Datenerfassung mittels Digital Analyzer (NanoString Technologies®). Alle Schritte der Probenvorbereitung bis zur Analyse folgten strikt den Herstellerprotokollen zur Verwendung von nCounter® Elements™ TagSets und der Nutzung des nCounter® Analyse Systems [163, 164].

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte unter Verwendung der nSolver4.0 Analyse-Software (NanoString Technologies®), einschließlich der Hintergrundsubtraktion mit Negativkontrollen wie beschrieben in NanoString's *Gene Expression Data Analysis Guide* und *Analysis Software Manual* [165, 166]. Für die Normalisierung wurde der geometrische Mittelwert von 5 *Housekeeping*-Genen (*Gapdh*, *Hprt1*, *Polr2a*, *Rpl32*, *Rpl4*) verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert + Standardabweichung

(SD) dargestellt. Die Validierungsergebnisse wurden mittels *one-way* ANOVA mit Newman-Keuls *post hoc* getestet. Alle verwendeten Oligonukleotid-Sonden sind im Detail in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 3.11) aufgelistet.

**Tabelle 3.11: nCounter® zielgenspezifisches Oligonukleotid-Sondendesign.**

Gen ID	Beschreibung	Referenz-ID	Position (bp)
Acta1	Actin, alpha 1, skeletal muscle	NM_001272041.1	172-271
Col1a1	Collagen, type I, alpha 1	NM_007742.3	216-315
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_001001303.1	891-990
Hprt1	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	NM_013556.2	31-130
Myh7	Myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta	NM_080728.2	1133-1232
Nppa	Natriuretic peptide type A	NM_008725.2	691-790
Nppb	Natriuretic peptide type B	NM_008726.4	177-276
Polr2a	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A	NM_009089.2	2221-2320
Postn	Periostin, osteoblast specific factor	NM_015784.2	760-859
Rcan1	Regulator of calcineurin 1	NM_001081549.1	1061-1160
Rpl32	Ribosomal protein L32	NM_172086.1	61-160
Rpl4	Ribosomal protein L4	NM_024212.4	1323-1422
Timp1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	NM_011593.2	437-536



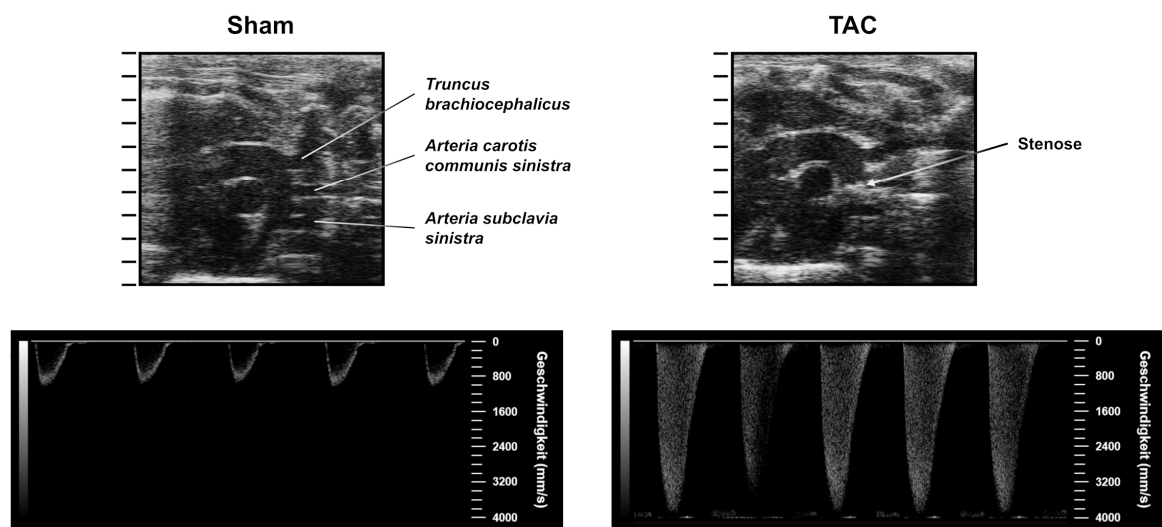


## 4. Ergebnisse

### 4.1 Modellcharakterisierung nach transverser Aortenkonstriktion (TAC) und Phänotypisierung nach Behandlung mit Riociguat

#### 4.1.1 Erhebung der kardialen Funktionsparameter

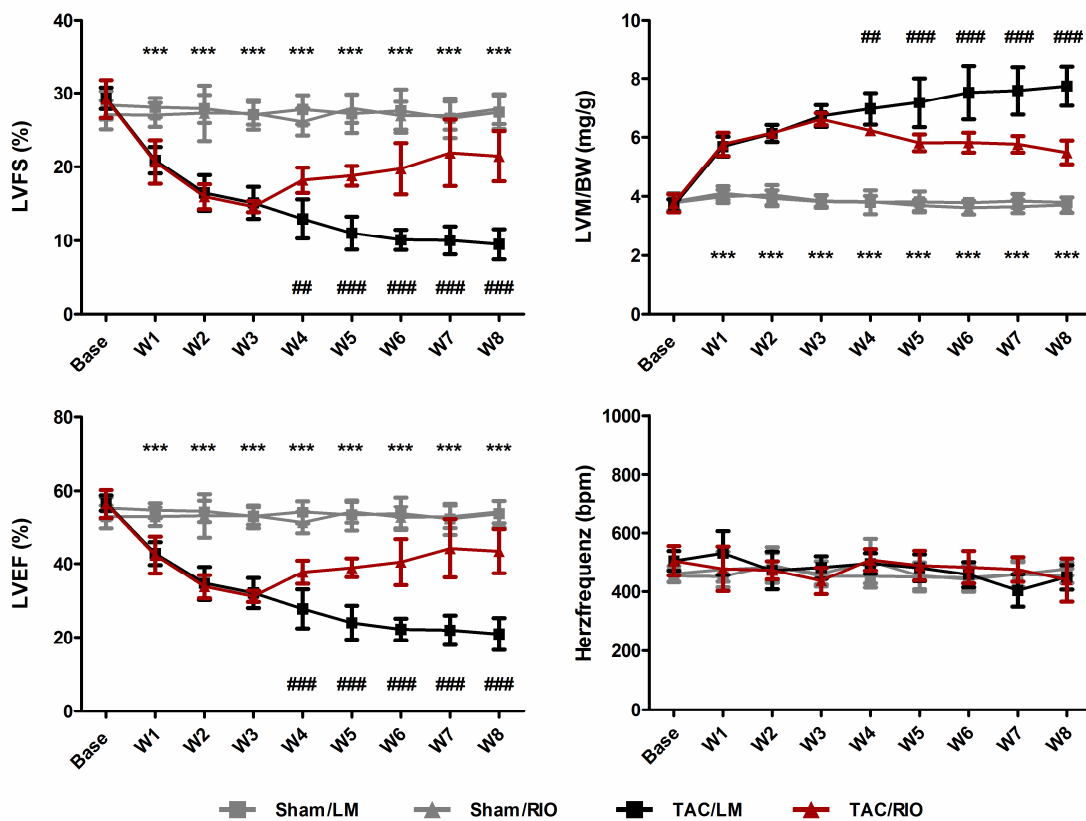
Die Herzaktion der einzelnen Tiere wurde über den gesamten Versuchszeitraum von 8 Wochen hinweg einmal wöchentlich mittels Kleintierechokardiographie evaluiert und die entsprechenden Funktionsparameter anhand der generierten Bilder erhoben. Über die Aufnahme des Aortenbogens konnte eine Ligatur der Aorta bei den TAC-operierten Tieren verifiziert werden. Diese galt als bestätigt, bei einer Flussgeschwindigkeit  $\geq 4000$  mm/s. Abbildung 4.1 zeigt exemplarisch die echokardiographische Aufnahme des Aortenbogens eines Sham- und eines TAC-Tieres im Vergleich. Die Stenose der Aorta nach TAC (Pfeil) und die daraus resultierende Erhöhung der Flussgeschwindigkeit sind deutlich sichtbar.



**Abb. 4.1:** Echokardiographische Aufnahme des Aortenbogens in Sham und TAC. Gezeigt wird der Aortenbogen eines Sham-operierten Tieres (links) im Vergleich zu einem TAC-operierten Tier (rechts) zusammen mit der gemessenen Flussgeschwindigkeit aus dem PW-Doppler. Sowohl die Verengung aufgrund der Aortenkonstriktion (Pfeil) als auch die daraus resultierende stark erhöhte Flussgeschwindigkeit an der Engstelle sind deutlich zu erkennen. (Skala oben: in mm)

Anhand der erhobenen kardialen Parameter zeigte sich eine deutliche Verschlechterung der linksventrikulären Pumpfunktion durch TAC im Verlauf der 8 Versuchswochen. Während die Werte innerhalb der Sham-Gruppen relativ konstant über die Zeit blieben, waren sowohl LVFS als auch

LVEF bereits nach der ersten postoperativen Woche signifikant verringert in TAC<sub>/LM</sub> im Vergleich zu Sham<sub>/LM</sub> (LVFS:  $20,9 \pm 1,8\%$  vs.  $28,0 \pm 1,3\%$ ; LVEF:  $42,8 \pm 3,1\%$  vs.  $54,6 \pm 2,2\%$ ) und sanken bis Woche 8 noch weiter auf eine LVFS von  $9,5 \pm 2,1\%$  und LVEF von  $20,9 \pm 4,3\%$  in TAC<sub>/LM</sub> ab (Abb. 4.2, Tab. 4.1). Eine Verschlechterung der Herzfunktion war in fast identischer Weise in den TAC-Tieren mit späterer Medikation (TAC<sub>/RIO</sub>) bis Woche 3 zu beobachten. Eine Woche nach Beginn der Riociguat-Behandlung stagnierte diese Verschlechterung und die Werte verbesserten sich wieder. Ab Woche 4 bis zum Ende der Studie waren LVFS und LVEF in TAC<sub>/RIO</sub> signifikant höher im Vergleich zu unbehandelten TAC-Tieren (W4 LVFS:  $18,2 \pm 1,5\%$  vs.  $12,9 \pm 2,6\%$ ; LVEF:  $37,7 \pm 3,2\%$  vs.  $27,7 \pm 5,3\%$ ).



**Abb. 4.2: Zeitlicher Verlauf der erhobenen kardialen Funktionsparameter Sham- und TAC-operierter Tiere innerhalb der verschiedenen Behandlungsgruppen.** Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  SD der erhobenen Daten aus der Kleintierechokardiographie. Medikationsbeginn nach 3 Wochen post-OP (W3). Es zeigte sich ein Verlust der Pumpfunktion aufgrund von TAC in sowohl abfallender linksventrikulärer Verkürzungsfraktion (LVFS) als auch Ejektionsfraktion (LVEF). Gleichzeitig konnte eine Hypertrophie des Herzens im Anstieg der linksventrikulären Masse im Verhältnis zum Körpergewicht (LVM/BW) beobachtet werden. In den Riociguat behandelten TAC-Tieren zeigte sich eine signifikante Verbesserung dieser Parameter bereits eine Woche nach Beginn der Medikation (W4). Die Herzfrequenz wies weder Unterschiede im zeitlichen Verlauf noch zwischen den verschiedenen Gruppen auf. (n = 6, außer Sham<sub>/LM</sub>: n = 5; TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>: \*\*\* p < 0,001; TAC<sub>/RIO</sub> vs. TAC<sub>/LM</sub>: ### p < 0,001, ## p < 0,01)

Ebenfalls in Abbildung 4.2 und Tabelle 4.1 dargestellt ist die Veränderung der linksventrikulären Masse (LVM) innerhalb der verschiedenen Behandlungsgruppen über die Zeitpunkte hinweg. Um eventuell unterschiedliches Wachstumsverhalten der Tiere zu berücksichtigen, wurde die LVM auf das jeweilige Körpergewicht des entsprechenden Tieres normalisiert (LVM/BW). Zu beobachten war eine deutliche Massenzunahme der linken Ventrikel aufgrund der Aortenkonstriktion, signifikant im Vergleich TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub> wieder ab der ersten Woche nach OP. Das LVM/BW Ratio in TAC<sub>/LM</sub> stieg dabei von  $3,69 \pm 0,21$  mg/g (Base) innerhalb einer Woche auf  $5,68 \pm 0,33$  mg/g (W1) und erreichte ein Maximum von  $7,74 \pm 0,67$  mg/g in Woche 8, während die linksventrikulären Massen in den Sham-Tieren wieder relativ konstant über die Zeit hinweg blieben. Diese voranschreitende Hypertrophie durch TAC war in den medikamentös mit Riociguat behandelten Tieren ab W4 nicht mehr zu sehen. Wie auch bei LVFS und LVEF verbesserten sich die Werte in TAC<sub>/RIO</sub> mit Beginn der Medikation ab Woche 3.

Ein Einfluss von Riociguat auf die Funktionsparameter gesunder Sham-Tiere konnte nicht beobachtet werden. Hierbei zeigten sich für die eben beschriebenen Parameter LVFS, LVEF und LVM/BW gleichbleibende Werte über den gesamten Versuchszeitraum. Ebenfalls konnten keine Unterschiede in der Herzfrequenz festgestellt werden. Diese blieb über die Zeitpunkte hinweg konstant, unabhängig davon ob die Mäuse TAC bzw. Sham operiert waren, Riociguat erhielten oder nicht (Abb. 4.2, Tab. 4.1).

Auch wenn sich eine signifikante Verbesserung der kardialen Funktionsparameter im TAC-Modell durch die Applikation von Riociguat im direkten Vergleich der erkrankten Tiere mit und ohne Medikation zeigte, so erreichten die Werte doch nicht wieder das Niveau gesunder Sham-Tiere. Tabelle 4.1 listet hierbei nicht nur die Werte der erhobenen Parameter auf, sondern verdeutlicht ebenfalls, dass die Herzfunktion in TAC-Mäusen zu jedem postoperativen Zeitpunkt signifikant schlechter war im Vergleich zur entsprechenden Sham-Kontrollgruppe (TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>, TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub>).

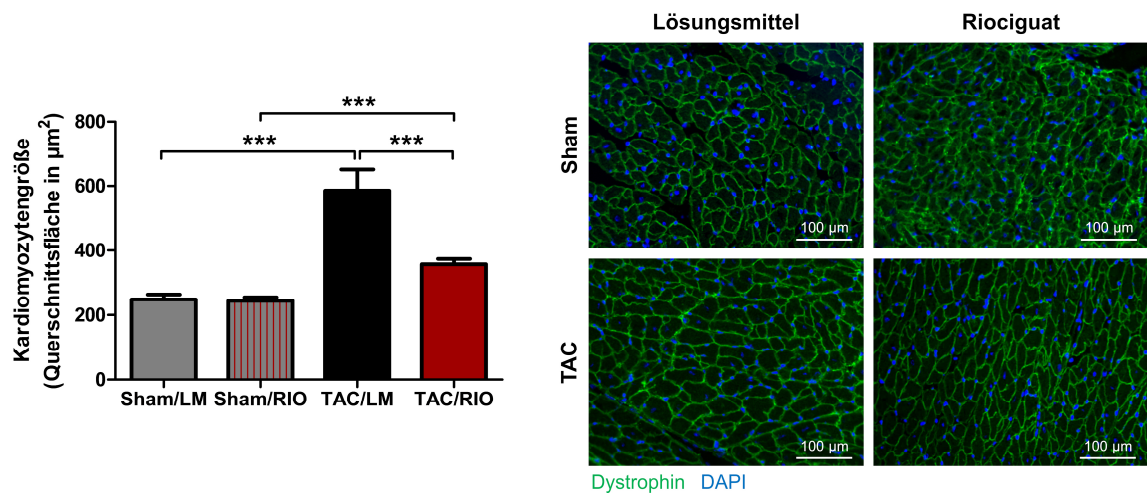
Alle weiteren Parameter (LVESV, LVEDV, LVID;d, LVID;s), die zur Berechnung der eben dargestellten Werte für LVFS und LVEF benötigt wurden (s. Kapitel 3.1.3, Tab. 3.1), sind im Anhang in Abbildung 7.1 und Tabelle 7.1 aufgeführt.

**Tabelle 4.1: Werte der erhobenen kardialen Funktionsparameter.** Die Tabelle zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SD von LVEF, LVM/BW, LVFS und Herzfrequenz. Signifikante Unterschiede sind in TAC im Vergleich zur entsprechenden Sham-Gruppe gekennzeichnet. (\*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ )

	LVFS (%)				LVM/BW (mg/g)			
	Sham/LM	TAC/LM	Sham/RIO	TAC/RIO	Sham/LM	TAC/LM	Sham/RIO	TAC/RIO
<b>Base</b>	28,3 $\pm$ 2,0	29,3 $\pm$ 1,5	27,0 $\pm$ 1,9	29,2 $\pm$ 2,6	3,82 $\pm$ 0,29	3,69 $\pm$ 0,21	3,78 $\pm$ 0,13	3,77 $\pm$ 0,31
<b>W1</b>	28,0 $\pm$ 1,3	20,9 $\pm$ 1,8 ***	27,0 $\pm$ 1,6	20,7 $\pm$ 2,9 ***	4,11 $\pm$ 0,23	5,68 $\pm$ 0,33 ***	4,00 $\pm$ 0,22	5,76 $\pm$ 0,39 ***
<b>W2</b>	27,8 $\pm$ 1,9	16,5 $\pm$ 2,4 ***	27,3 $\pm$ 3,8	16,0 $\pm$ 1,7 ***	3,94 $\pm$ 0,26	6,13 $\pm$ 0,29 ***	4,04 $\pm$ 0,34	6,15 $\pm$ 0,14 ***
<b>W3</b>	27,0 $\pm$ 2,0	15,1 $\pm$ 2,2 ***	27,2 $\pm$ 1,5	14,6 $\pm$ 0,7 ***	3,83 $\pm$ 0,21	6,72 $\pm$ 0,37 ***	3,84 $\pm$ 0,19	6,61 $\pm$ 0,20 ***
<b>W4</b>	27,7 $\pm$ 2,0	12,9 $\pm$ 2,6 ***	26,1 $\pm$ 1,8	18,2 $\pm$ 1,7 ***	3,80 $\pm$ 0,40	6,97 $\pm$ 0,54 ***	3,83 $\pm$ 0,19	6,23 $\pm$ 0,06 ***
<b>W5</b>	27,2 $\pm$ 2,6	11,0 $\pm$ 2,2 ***	27,9 $\pm$ 1,9	18,8 $\pm$ 1,3 ***	3,81 $\pm$ 0,35	7,18 $\pm$ 0,83 ***	3,69 $\pm$ 0,19	5,81 $\pm$ 0,28 ***
<b>W6</b>	27,5 $\pm$ 3,0	10,1 $\pm$ 1,3 ***	26,9 $\pm$ 1,9	19,7 $\pm$ 3,5 ***	3,79 $\pm$ 0,18	7,52 $\pm$ 0,91 ***	3,62 $\pm$ 0,23	5,82 $\pm$ 0,34 ***
<b>W7</b>	26,6 $\pm$ 2,7	10,0 $\pm$ 1,9 ***	26,9 $\pm$ 1,9	21,9 $\pm$ 4,5 **	3,85 $\pm$ 0,23	7,58 $\pm$ 0,81 ***	3,66 $\pm$ 0,22	5,77 $\pm$ 0,28 ***
<b>W8</b>	27,4 $\pm$ 2,3	9,5 $\pm$ 2,1 ***	27,8 $\pm$ 2,0	21,4 $\pm$ 3,4 ***	3,79 $\pm$ 0,09	7,74 $\pm$ 0,67 ***	3,70 $\pm$ 0,26	5,49 $\pm$ 0,40 ***
	LVEF (%)				Herzfrequenz (bpm)			
	Sham/LM	TAC/LM	Sham/RIO	TAC/RIO	Sham/LM	TAC/LM	Sham/RIO	TAC/RIO
<b>Base</b>	55,2 $\pm$ 3,1	56,6 $\pm$ 2,2	52,9 $\pm$ 3,2	56,4 $\pm$ 3,9	454 $\pm$ 22	505 $\pm$ 34	460 $\pm$ 28	505 $\pm$ 50
<b>W1</b>	54,6 $\pm$ 2,2	42,8 $\pm$ 3,1 ***	52,9 $\pm$ 2,6	42,4 $\pm$ 5,1 ***	451 $\pm$ 18	532 $\pm$ 75	476 $\pm$ 62	478 $\pm$ 76
<b>W2</b>	54,3 $\pm$ 3,0	34,6 $\pm$ 4,5 ***	53,1 $\pm$ 6,0	33,7 $\pm$ 3,2 ***	491 $\pm$ 62	472 $\pm$ 65	483 $\pm$ 49	473 $\pm$ 31
<b>W3</b>	52,9 $\pm$ 3,2	32,0 $\pm$ 4,1 ***	53,0 $\pm$ 2,4	31,1 $\pm$ 1,5 ***	452 $\pm$ 28	482 $\pm$ 39	461 $\pm$ 43	436 $\pm$ 45
<b>W4</b>	54,1 $\pm$ 3,1	27,7 $\pm$ 5,3 ***	51,3 $\pm$ 2,9	37,7 $\pm$ 3,2 ***	452 $\pm$ 39	496 $\pm$ 36	504 $\pm$ 77	509 $\pm$ 37
<b>W5</b>	53,3 $\pm$ 4,2	24,0 $\pm$ 4,6 ***	54,1 $\pm$ 2,9	38,9 $\pm$ 2,6 ***	449 $\pm$ 49	482 $\pm$ 46	454 $\pm$ 46	489 $\pm$ 51
<b>W6</b>	53,7 $\pm$ 4,5	22,2 $\pm$ 2,9 ***	52,6 $\pm$ 3,0	40,4 $\pm$ 6,3 ***	447 $\pm$ 42	458 $\pm$ 44	442 $\pm$ 42	483 $\pm$ 56
<b>W7</b>	52,2 $\pm$ 4,3	21,9 $\pm$ 4,0 ***	52,8 $\pm$ 3,1	44,2 $\pm$ 7,9 **	459 $\pm$ 46	404 $\pm$ 54	458 $\pm$ 43	476 $\pm$ 43
<b>W8</b>	53,6 $\pm$ 3,7	20,9 $\pm$ 4,3 ***	54,2 $\pm$ 3,1	43,4 $\pm$ 6,0 ***	478 $\pm$ 22	449 $\pm$ 42	453 $\pm$ 25	439 $\pm$ 74

### 4.1.2 Charakterisierung der Hypertrophie

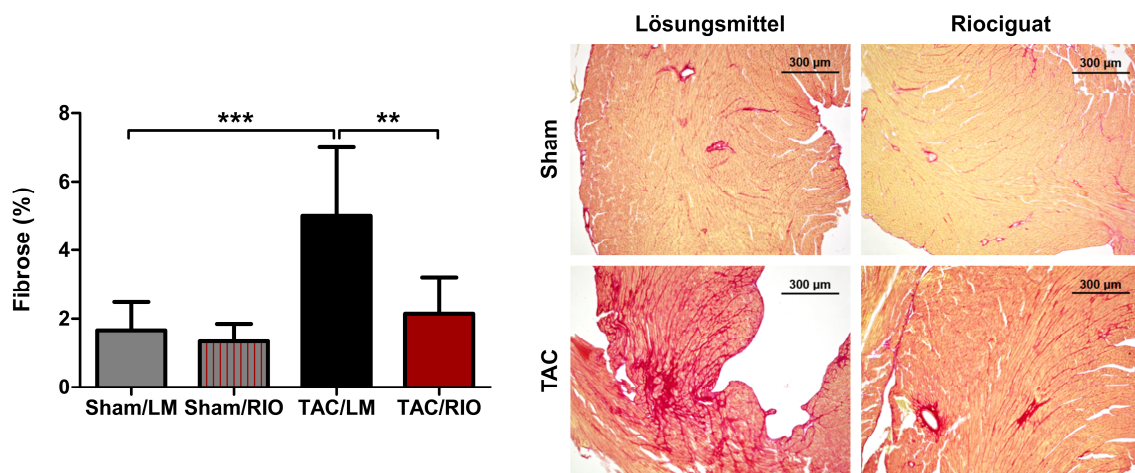
Um die beobachtete hypertrophe Antwort (LVM/BW, Abb. 4.2) aufgrund der Aortenkonstriktion und die Auswirkung der Riociguat-Behandlung darauf auch auf zellulärer Ebene nachvollziehen zu können, wurden Kardiomyozytenquerschnitte in Dystrophin-gefärbten Kryoschnitten ausgemessen. Abbildung 4.3 zeigt die gemessenen Myozytengrößen explantierter Herzen zum Endzeitpunkt 8 Wochen nach OP. Mit einer mehr als doppelt so großen Querschnittsfläche, waren die Myozyten in TAC<sub>/LM</sub> im Vergleich zu denen der Sham-Tiere stark vergrößert. Es konnte eine signifikant verringerte hypertrophe Antwort in TAC<sub>/RIO</sub> im Vergleich zu TAC<sub>/LM</sub> beobachtet werden, wobei die Myozytenquerschnittsflächen dennoch signifikant größer im Vergleich zu der entsprechenden Sham-Kontrollgruppe waren. Ein Größenunterschied der Kardiomyozyten zwischen Sham<sub>/LM</sub> und Sham<sub>/RIO</sub> konnte nicht festgestellt werden.



**Abb. 4.3: Quantifizierung der Kardiomyozytengröße in kardialen Kryoschnitten der verschiedenen Behandlungsgruppen.** Die Auswertung erfolgte nach Dystrophin-Immunsfärbung. Links: Quantifizierung, abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  SD. Rechts: Repräsentative Aufnahmen. Eine deutliche Vergrößerung der Myozytenquerschnitte konnte in den TAC-operierten Tieren beobachtet werden, jedoch in signifikant abgeschwächter Form in den RIO-behandelten TAC-Tieren. (n = 6, außer TAC<sub>/RIO</sub>: n = 7; \*\*\* p < 0,001)

### 4.1.3 Charakterisierung der kardialen Fibrosierung

Mittels Siriusrot-Färbung wurden Kollagenfasern in Paraffinschnitten von Herzen der verschiedenen Behandlungsgruppen zum Endzeitpunkt nach 8 Wochen angefärbt und quantifiziert, um Rückschlüsse auf die kardiale Fibrosierung nach TAC und die Auswirkung der Medikation mit Riociguat zu ziehen. Die Abbildung 4.4 zeigt signifikant erhöhte Fibrose in den Herzen TAC-operierter Mäuse im Vergleich zu gesunden Sham-Tieren. Deutlich verringert waren die Anteile an fibrotischen Arealen in TAC-Tieren nach der fünfwöchigen Behandlung mit Riociguat, und es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und nicht-behandelten TAC-Herzen festgestellt. Der etwas höhere Fibrosierungsgrad in TAC<sub>RIO</sub> im Vergleich zu Sham<sub>RIO</sub> war nicht signifikant. Ein Unterschied zwischen Sham<sub>LM</sub> und Sham<sub>RIO</sub> wurde nicht beobachtet.

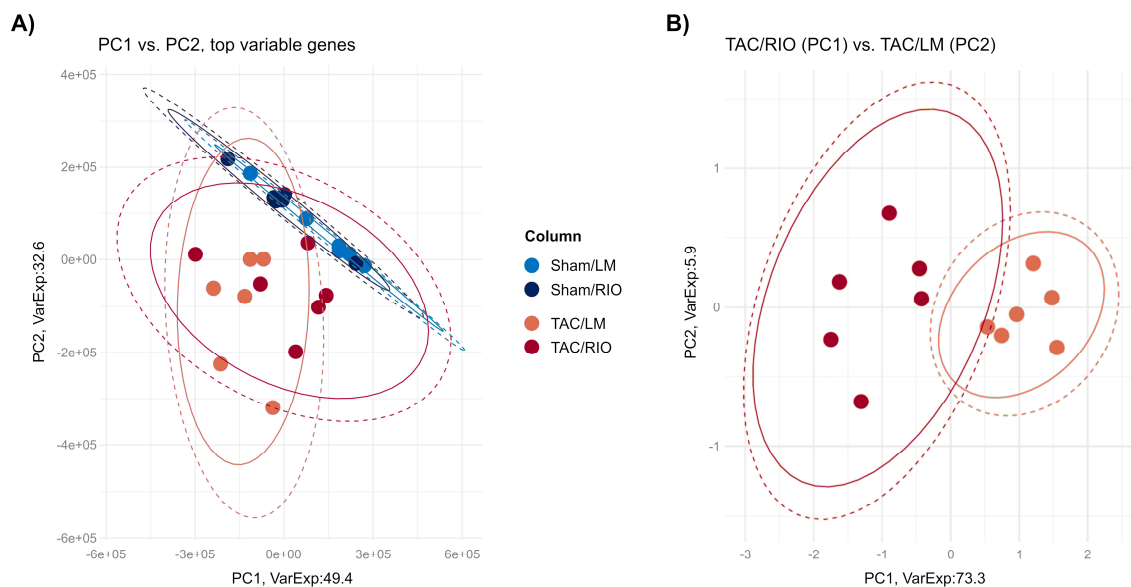


**Abb. 4.4: Quantifizierung der Fibrosierung in kardialen Paraffinschnitten der verschiedenen Behandlungsgruppen.** Die Auswertung erfolgte nach Siriusrot-Färbung. Links: Quantifizierung, abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  SD. Rechts: Repräsentative Aufnahmen. Fibrotische Areale zeigten sich signifikant vermehrt in den TAC-Tieren, jedoch deutlich reduziert in den erkrankten Tieren mit RIO-Behandlung. (n = 6 in Sham<sub>LM</sub> und Sham<sub>RIO</sub>, n = 7 in TAC<sub>LM</sub> und TAC<sub>RIO</sub>; \*\*\* p < 0,001, \*\* p < 0,01)

## 4.2 Einfluss der Riociguat-Behandlung auf das murine linksventrikuläre Transkriptom nach TAC

### 4.2.1 Relative Quantifizierung der Unterschiede im Transkriptom herzinsuffizienter Mäuse mit und ohne Riociguatmedikation

Die extrahierte mRNA aller 24 explantierter linken Ventrikel der 4 verschiedenen Behandlungsgruppen (Sham<sub>/LM</sub>, Sham<sub>/RIO</sub>, TAC<sub>/LM</sub>, TAC<sub>/RIO</sub>) wurde mittels HiSeq® 4000 System sequenziert. Die erhaltenen RNA-Seq Rohdaten (*raw counts*) wurden anschließend unter Verwendung der Bioconductor Software DESeq2 in R weiterverarbeitet und die normalisierten *Counts* der identifizierten Transkripte berechnet. Insgesamt wurden 18581 Transkripte identifiziert und quantifiziert. Eine Hauptkomponentenanalyse (PCA, *Principle Component Analysis*) der RNA-Seq Daten wurde durchgeführt, um einen ersten Eindruck über die Variation innerhalb der Gruppen und die Unterschiede zwischen den vier Gruppen zu gewinnen (Abb. 4.5). Jeder Punkt in der Abbildung stellt dabei ein Tier dar und die verschiedenen Farben zeigen die jeweilige Gruppenzugehörigkeit an. Punkte in unmittelbarer Nähe zueinander deuten auf geringe Gesamtvariation des Transkriptoms hin. Je weiter die Punkte voneinander entfernt sind, desto mehr unterscheiden sich die einzelnen Proben in ihrem Transkriptomuster.



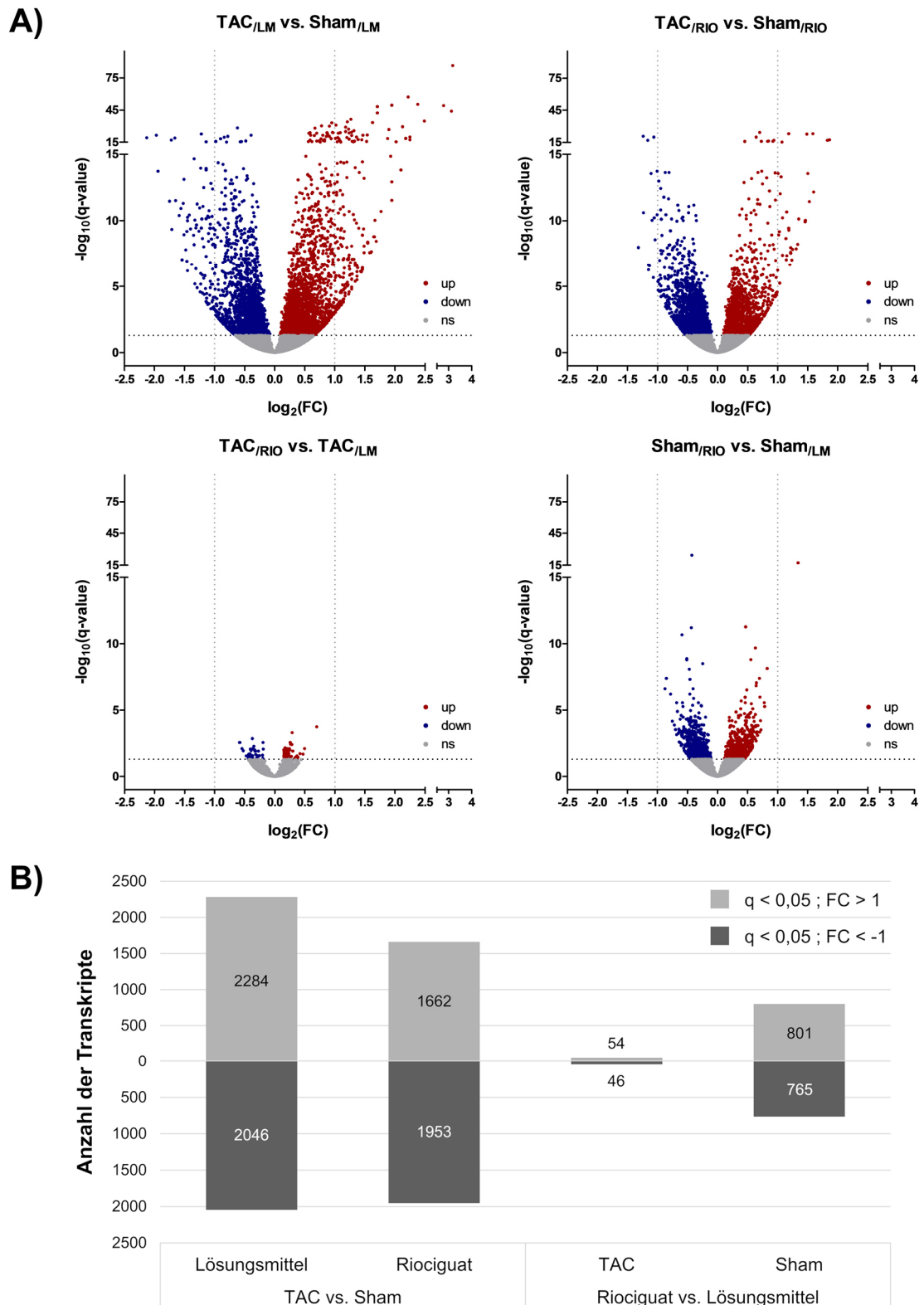
**Abb. 4.5: Hauptkomponentenanalyse (PCA-Plot) auf Basis der TOP variablen Gene der verschiedenen Behandlungsgruppen.** Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied sowohl zwischen TAC und Sham operierten Tieren (**A**) als auch eine distinkte Gruppierung der Behandlungsgruppen innerhalb der TAC-Tiere (**B**). (n=6)

Diese erste Hauptkomponentenanalyse zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen dem kardialen Transkriptom gesunder Sham- und erkrankter TAC-Tiere (Abb. 4.5A). Des Weiteren war eine distinkte Gruppierung bzw. Trennung zwischen Riociguat behandelten und unbehandelten TAC-Tieren zu beobachten, wobei die interindividuelle Varianz innerhalb der TAC<sub>/LM</sub>-Gruppe deutlich geringer war als in TAC<sub>/RIO</sub> (Abb. 4.5B). Dies weist bereits darauf hin, dass sowohl TAC-OP als auch Riociguatmedikation in TAC-operierten Mäusen zu signifikanten Unterschieden im murinen, linksventrikulären Transkriptom führte. Ein Unterschied zwischen Sham<sub>/LM</sub> und Sham<sub>/RIO</sub> konnte mittels PCA nicht festgestellt werden.

Für eine relative Quantifizierung wurden Vergleiche zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen herangezogen und näher betrachtet. Der Fokus der vergleichenden Analysen lag dabei einerseits auf den Auswirkungen der TAC-OP auf Tiere mit (TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub>) und ohne Riociguatmedikation (TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>), andererseits auf dem direkten Einfluss von Riociguat auf erkrankte (TAC<sub>/RIO</sub> vs. TAC<sub>/LM</sub>) und gesunde (Sham<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>) Tiere. Als statistisch signifikant in ihrer Abundanz verändert galten Transkripte mit adjustierten p-Werten kleiner als 0,05 ( $q < 0,05$ ).

Abbildung 4.6 zeigt einerseits die Verteilung von hoch- und runterregulierten Transkripten (Abb. 4.6A), andererseits die Anzahl aller signifikant veränderten Transkripte der verschiedenen Vergleichsgruppen, ohne dabei die Stärke der Veränderung zu bewerten (Abb. 4.6B). Die meisten und stärksten Veränderungen waren aufgrund der Aortenkonstriktion ohne pharmakologische Behandlung in TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub> zu beobachten. Insgesamt wiesen hierbei 4330 Transkripte veränderte Abundanzen auf (2284 $\uparrow$ , 2046 $\downarrow$ ). Deutlich weniger und auch weniger starke Veränderungen waren dagegen in Riociguat behandelten TAC-Tieren im Vergleich zu Riociguat behandelten Sham-Tieren zu beobachten, insgesamt 3615 (1662 $\uparrow$ , 1953 $\downarrow$ ). Interessanterweise zeigte der direkte Vergleich von TAC<sub>/RIO</sub> vs. TAC<sub>/LM</sub> die wenigsten Veränderungen mit insgesamt 100 veränderten Transkripten (54 $\uparrow$ , 46 $\downarrow$ ). Eine ausführliche Auflistung aller identifizierten Transkripte der RNA-Seq Analysen und deren Veränderungen ist dem **Anhang S1** zu entnehmen





**Abb. 4.6: Anzahl veränderter Transkripte der verschiedenen Vergleichsgruppen. A)** Volcano-Plots (Rot: signifikant erhöhte Expression; Blau: signifikant verringerte Expression; Grau: nicht signifikant) **B)** Balken zeigen von links nach rechts folgende Vergleiche: Auswirkungen von TAC in Lösungsmittel behandelten Tieren ( $TAC_{LM}$  vs.  $Sham_{LM}$ ), Auswirkungen von TAC in Riociguat behandelten Tieren ( $TAC_{RIO}$  vs.  $Sham_{RIO}$ ), Einfluss von Riociguat in TAC-Tieren ( $TAC_{RIO}$  vs.  $TAC_{LM}$ ), Einfluss von Riociguat in Sham-Tieren ( $Sham_{RIO}$  vs.  $Sham_{LM}$ ). ( $q < 0,05$ ;  $FC > |1|$ )

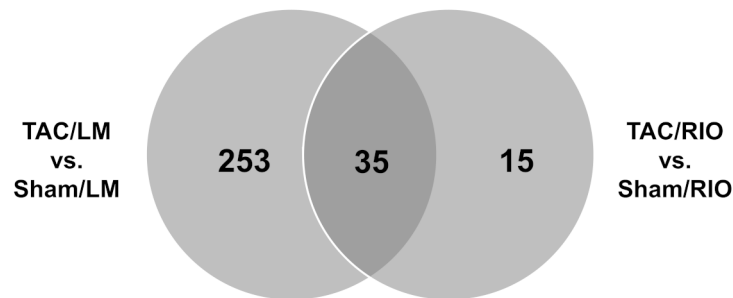
Das Ansetzen eines weiteren Filterkriteriums, nämlich der Stärke der Veränderung zwischen den verschiedenen Messwerten der Behandlungsgruppen (*FC*; *Fold Change*), trägt dazu bei, abseits der statistischen Signifikanz die biologische Relevanz besser beurteilen zu können. Betrachtet man nun die signifikant veränderten Transkripte, die mindestens eine 2fache Veränderung in ihrer Expression aufwiesen, so wird die Auswirkung einer Riociguatbehandlung auf das Transkriptom nach TAC bei einem indirekten Vergleich der ersten beiden Gruppen in Abbildung 4.7 am deutlichsten. Mit 288 (192 $\uparrow$ , 96 $\downarrow$ ) veränderten Transkripten ( $q < 0,05$ ;  $FC > |2|$ ) zeigte TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub> die meisten Veränderungen. Stellt man die Änderungen in TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub> dem gegenüber, sank die Zahl massiv. Nur 50 (35 $\uparrow$ , 15 $\downarrow$ ) identifizierte Transkripte wiesen noch einen  $FC \geq |2|$  auf. Ein direkter Vergleich der Auswirkung einer Medikation in TAC- (TAC<sub>/RIO</sub> vs. TAC<sub>/LM</sub>) und Sham-Tieren (Sham<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>) führte zu keiner bzw. einer vernachlässigbar geringen Identifikation veränderter Transkripte.



**Abb. 4.7: Anzahl aller signifikant und mindestens 2fach in ihrer Expression veränderten Transkripte der verschiedenen Vergleichsgruppen.** Balken zeigen von links nach rechts folgende Vergleiche: Auswirkungen von TAC in Lösungsmittel behandelten Tieren (TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>), Auswirkungen von TAC in Riociguat behandelten Tieren (TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub>), Einfluss von Riociguat in TAC-Tieren (TAC<sub>/RIO</sub> vs. TAC<sub>/LM</sub>), Einfluss von Riociguat in Sham-Tieren (Sham<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>). ( $q < 0,05$ ;  $FC \geq |2|$ )

Vergleicht man die Veränderungen der eben beschriebenen beiden übrigen Gruppenvergleiche, die sich aus den stringenten Toleranzgrenzen (*Cutoffs*:  $q < 0,05$ ;  $FC \geq |2|$ ) ergeben, zeigte sich, dass die meisten ( $n = 35$ ) der 50 veränderten Transkripte der Riociguat behandelten TAC-Tiere im Vergleich zu deren Sham-Kontrollgruppe eine Überschneidung mit denen der unbehandelten TAC-Tiere aufwiesen (Abb. 4.8). 15 hingegen zeigten keine Überschneidung und waren nur in

TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub> verändert. Der Großteil der signifikant veränderten Transkripte wurde jedoch ausschließlich in TAC-Tieren ohne Medikation identifiziert (n= 253).



**Abb. 4.8: Überschneidung der signifikant 2fach veränderten Transkripte aufgrund von TAC in Lösungsmittel und Riociguat behandelten Tieren.** Dargestellt ist die Anzahl der Transkripte, die mindestens eine 2fache Expressionsänderung ( $FC \geq |2|$ ) aufgrund der Aortenkonstriktion in Lösungsmittel (TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>) und Riociguat (TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub>) behandelten Tieren aufwiesen und deren Schnittmenge.

Da die direkten Gruppenvergleiche zur Auswirkung einer Riociguatbehandlung auf das linksventrikuläre Transkriptom in TAC- und Sham-Tieren nur wenige und bei stringenterer Filterung sogar keine Veränderungen mehr aufwiesen (Abb. 4.6 und 4.7), wurden für weitere Analysen oftmals nur die Vergleiche von TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub> und TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub> gegenübergestellt und für nähere Betrachtungen herangezogen.

## 4.2.2 Funktionelle Klassifizierung differentiell exprimierter Gene

Eine funktionelle Klassifizierung der differentiell exprimierten Gene (DEG) erfolgte unter Verwendung der Software und Datenbank Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®). Mit dieser Software können Genprodukte auf Basis publizierter Daten zu funktionellen Kategorien zusammengefasst und deren Anreicherung bzw. Überrepräsentation identifiziert werden. Als Maß für eine signifikante Häufung von DEGs zu einem Signalweg (*Pathway*) wird einerseits ein p-Wert bestimmt (Fisher's Exact Test), andererseits dient der sogenannte z-Score als Maß für die Ausrichtung der Regulation der jeweiligen Kategorie und zeigt Aktivierung ( $z\text{-Score} \geq 2$ ) oder Inhibierung ( $z\text{-Score} \leq -2$ ) an.

Eine IPA®-Analyse aller signifikant veränderten DEGs ( $q < 0,05$ ) der verschiedenen Vergleichsgruppen gab Aufschluss über die am stärksten beeinflussten Signalwege hinsichtlich ihrer Aktivierung oder Inhibierung (Abb. 4.9). Die TAC-induzierte Drucküberlastung (TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>) war besonders mit der Aktivierung von gewebe- und zellstrukturspezifischen Signalwegen, wie *Actin Cytoskeleton*, *Integrin* und *ILK Signaling* assoziiert. Des Weiteren zeigten sich Signalwege der kardialen Stressantwort, wie *Cardiac Hypertrophy*, *Fibrosis* und *GP6 Signaling*, als signifikant

aktiviert. Verschiedene Rho assoziierte Signalwege, wie sowohl *RhoA*, *Rho Family GTPases* und *RhoGDI Signaling* als auch *Regulation of Actin-based Motility by Rho* waren aufgrund der TAC-OP ebenfalls stark beeinflusst.



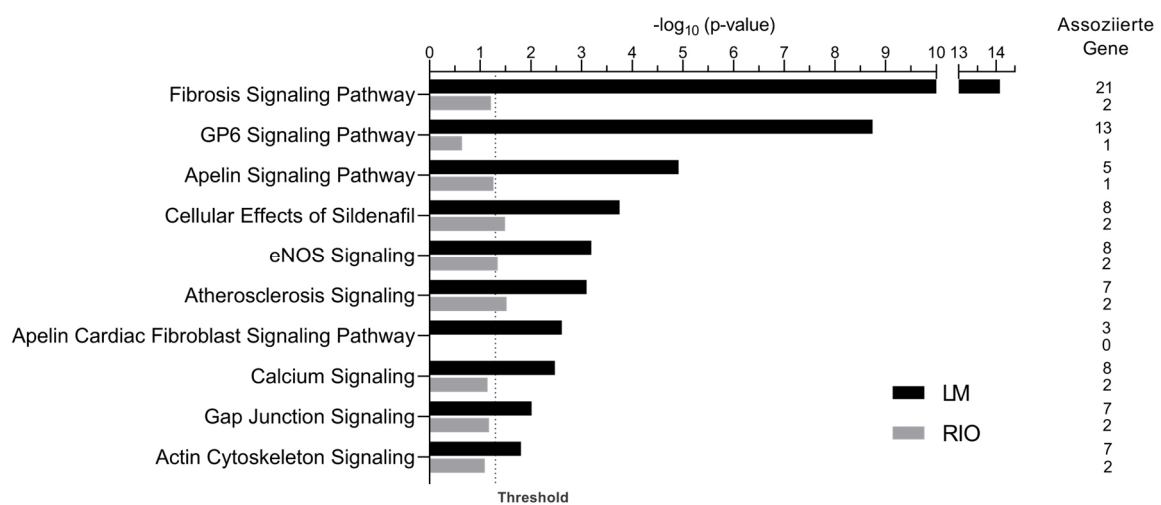
**Abb. 4.9: Activation z-Score Analyse aller differentiell veränderten Gene der verschiedenen Vergleichsgruppen.**

Eine Analyse der *downstream* beeinflussten Signalwege wurde für alle differentiell veränderten Gene der verschiedenen Vergleichsgruppen durchgeführt ( $q < 0,05$ ). Z-Scores verdeutlichen die Ausrichtung der vorhergesagten Regulation, wobei ein z-Score  $\geq 2$  eine signifikante Aktivierung (Orange) des Signalweges und ein z-Score  $\leq -2$  eine signifikante Inhibierung (Dunkelblau) anzeigt. Nicht signifikante Regulationen zwischen 2 und -2 sind schraffiert dargestellt.

Betrachtet man diese Signalwege nun im direkten Vergleich von behandelten und unbehandelten TAC-Tieren (TAC<sub>/RIO</sub> vs. TAC<sub>/LM</sub>), um Effekte einer Riociguatbehandlung zu identifizieren, so zeigt sich ein revertierender Effekt nur bei *Actin Cytoskeleton Signaling*. Für alle anderen Signalwege konnte bei dieser Vergleichsgruppe kein z-Score berechnet werden. Allerdings gibt der indirekte Vergleich zu behandelten Tieren (TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub>) einen sehr guten Einblick in die Auswirkung der Medikation auf erkrankte Tiere. Die durch TAC beeinflussten Signalwege zeigten hierbei eine deutliche Abschwächung hinsichtlich ihrer Aktivierung bzw. Inhibierung durch die Behandlung. Wenige signifikante Regulationen zeigten sich hingegen bei einem direkten Vergleich der gesunden Sham-Tiere mit und ohne Medikation (Sham<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>). Während *Regulation of Actin-based Motility by Rho*, *Actin Cytoskeleton* und *Integrin Signaling* mit einem z-Score  $\geq 2$  signifikant aktiviert waren, zeigte sich *RhoGDI Signaling* mit einem z-Score  $\leq -2$  signifikant inhibiert.

Eine genauere Analyse der am stärksten beeinflussten Signalwege aufgrund der TAC-OP (TOP10) in Lösungsmittel und Riociguat behandelten Tieren unter Berücksichtigung der signifikant und mit einem FC  $\geq |2|$  veränderten DEGs ist in Abbildung 4.10 dargestellt. Neben der Überrepräsentation

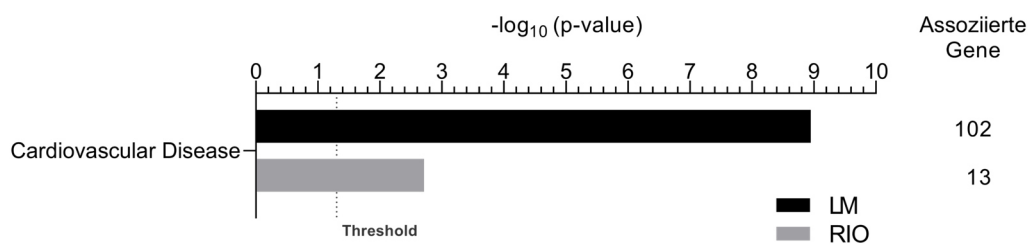
der verschiedenen Signalwege, abgebildet als negative log-transformierte p-Werte, ist die Anzahl der jeweils assoziierten Gene angegeben. Unter Einbeziehung einer starken Expressionsveränderung mit einem Faktor von 2 als *Cutoff* zeigte sich ein ähnliches Bild, wie zuvor beschrieben. Die höchste Zahl an DEGs mit signifikanter Anreicherung nach Vergleich von TAC<sub>LM</sub> vs. Sham<sub>LM</sub> wurde für Signalwege der kardialen Stressantwort (*Fibrosis Signaling Pathway*, *GP6 Signaling Pathway*), gefolgt von einer Reihe weiterer kardiovaskulär relevanter Signalwege (*Apelin Signaling Pathway*, *Cellular Effects of Sildenafil*, *eNOS Signaling*, *Atherosclerosis Signaling*, *Apelin Cardiac Fibroblast Signaling Pathway* und *Calcium Signaling*) und gewebe- bzw. zellstrukturspezifische Signalwege (*Gap Junction Signaling*, *Actin Cytoskeleton Signaling*) gefunden.



**Abb. 4.10: TOP10 Canonical Pathways mit signifikanter Anreicherung von DEGs aufgrund von TAC in Lösungsmittel und Riociguat behandelten Tieren.** Das Balkendiagramm stellt die Signifikanz der Überrepräsentation der funktionellen Signalwege als negative log-transformierte p-Werte dar. Abgebildet sind die 10 am stärksten beeinflussten Signalwege von TAC<sub>LM</sub> und TAC<sub>RIO</sub> im Vergleich zu deren Sham-Kontrollgruppe, zusammen mit der Anzahl assoziierter Gene mit signifikanter Expressionsänderung ( $q < 0,05$ ;  $FC \geq |2|$ ). (LM: Lösungsmittelgabe; RIO: Riociguatmedikation)

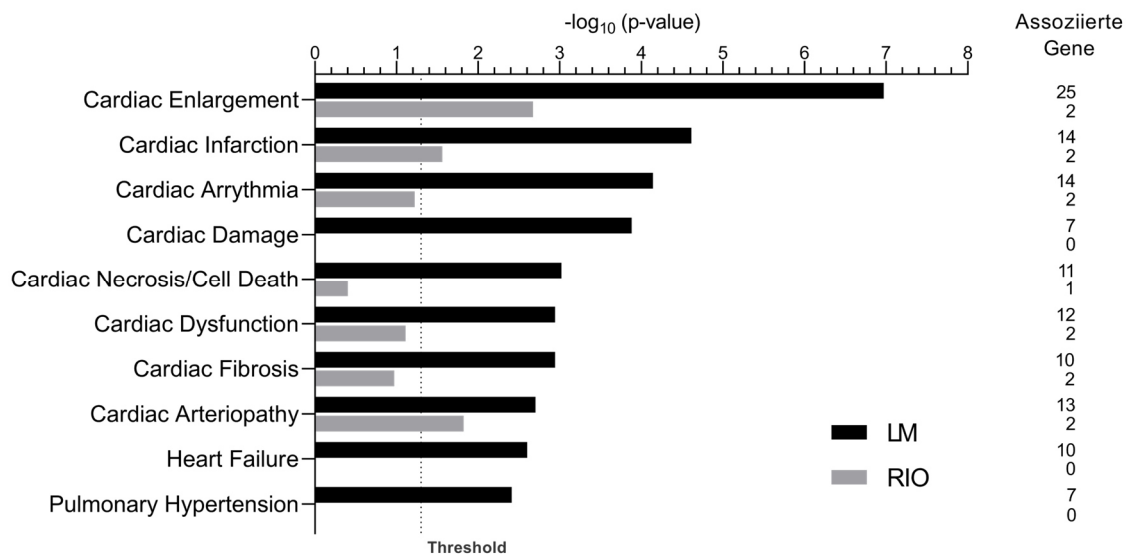
Betrachtet man nun dem gegenübergestellt die Auswirkungen auf eben diese TOP10 Signalwege in den Riociguat behandelten Tieren, zeigt sich sehr deutlich, dass die Signifikanzen für die jeweiligen Signalwege im indirekten Vergleich zwischen TAC<sub>LM</sub> und TAC<sub>RIO</sub> zu ihren entsprechenden Sham-Kontrollgruppen massiv verringert waren. Die meisten *Pathways*, wie z.B. *Fibrosis* und *Actin Cytoskeleton Signaling*, zeigten eine deutlich verringerte Anzahl assoziierter Gene und erreichten nicht einmal mehr die Signifikanzschwelle mit einem  $-\log_{10}(p\text{-Wert})$  von 1,3. Während z.B. 21 DEGs dem *Fibrosis Signaling* in TAC<sub>LM</sub> vs. Sham<sub>LM</sub> zugeordnet wurden und die höchste Signifikanz für diesen Signalweg mit einem  $-\log_{10}(p\text{-Wert}) > 14$  registriert wurde, waren in TAC<sub>RIO</sub> vs. Sham<sub>RIO</sub> nur 2 Gene dieses Weges differentiell exprimiert ( $-\log_{10}(p\text{-Wert}) < 1,3$ ) (Abb. 4.10).

Des Weiteren ermöglicht IPA eine Zuordnung der DEGs zu kardiovaskulären Erkrankungen (CVD, *Cardiovascular Diseases*), wodurch Gene oder Proteine hervorgehoben werden, die maßgeblich die Herzfunktion bestimmen. Insgesamt konnten 102 DEGs, deren Genexpression aufgrund von TAC signifikant verändert war ( $q < 0,05$ ;  $FC \geq |2|$ ), dieser Kategorie zugeordnet werden. Im Vergleich dazu wurden nach Riociguatmedikation nur noch 13 DEGs identifiziert, die funktionell zu CVDs zugeordnet werden (Abb. 4.11). Diese Zuordnung zu CVDs ergab für beide Gruppenvergleiche eine signifikante Anreicherung von DEGs, wobei die Signifikanz der Anreicherung in behandelten Tieren deutlich geringer war im Vergleich zu unbehandelten TAC-Tieren.



**Abb. 4.11: Zuordnung der aufgrund von TAC in Lösungsmittel und Riociguat behandelten Tieren signifikant veränderten Gene zu kardiovaskulären Erkrankungen.** Das Balkendiagramm stellt die Signifikanz der Überrepräsentation der funktionellen Kategorie als negative log-transformierte p-Werte dar. Abgebildet ist die Oberkategorie der kardiovaskulären Erkrankungen (CVD) für  $TAC_{LM}$  und  $TAC_{RIO}$  im Vergleich zu deren Sham-Kontrollgruppe, zusammen mit der Anzahl assoziierter Gene mit signifikanter Expressionsänderung ( $q < 0,05$ ;  $FC \geq |2|$ ). (LM: Lösungsmittelgabe; RIO: Riociguatmedikation)

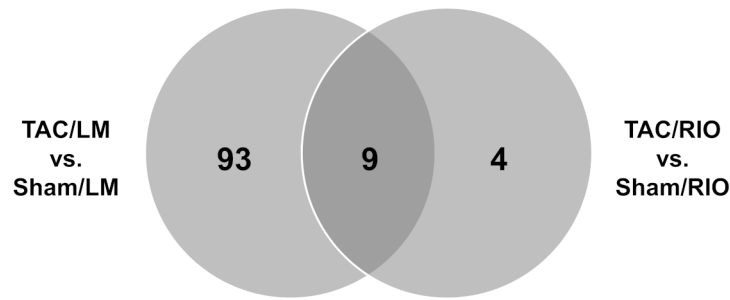
Abbildung 4.12 zeigt CVD assoziierte klinische bzw. pathologische Endpunkte und Phänotypen im Detail, sogenannte Kardiotoxizitätsfunktionen. Dargestellt sind hierbei die 10 am stärksten überrepräsentierten Kategorien in  $TAC_{LM}$  vs.  $Sham_{LM}$  im Vergleich zu  $TAC_{RIO}$  vs.  $Sham_{RIO}$ , zusammen mit deren Anzahl zugeordneter DEGs.



**Abb. 4.12: TOP10 Kardiotoxizitätsfunktionen mit signifikanter Anreicherung von DEGs aufgrund von TAC in Lösungsmittel und Riociguat behandelten Tieren.** Das Balkendiagramm stellt die Signifikanz der Überrepräsentation der funktionellen Kategorie als negative log-transformierte p-Werte dar. Abgebildet sind die 10 am stärksten beeinflussten, CVD assoziierten Signalwege von TAC<sub>/LM</sub> und TAC<sub>/RIO</sub> im Vergleich zu deren Sham-Kontrollgruppe, zusammen mit der Anzahl assoziierter Gene mit signifikanter Expressionsänderung ( $q < 0,05$ ;  $FC \geq |2|$ ). (LM: Lösungsmittelgabe; RIO: Riociguatmedikation)

Die stärkste Anreicherung von DEGs aufgrund von TAC zeigte sich für die CVD Kategorie *Cardiac Enlargement*, mit einem  $-\log_{10}(p\text{-Wert})$  von fast 7 und insgesamt 25 zugeordneten DEGs. Dem gegenübergestellt wurden in RIO behandelten TAC-Tieren nur noch 2 DEGs dieser Kategorie zugeordnet bei einem deutlich niedrigeren  $-\log_{10}(p\text{-Wert}) < 3$ . Wieder zeigte sich, dass in TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub> insgesamt deutlich weniger DEGs diesen Kategorien zugeordnet wurden. Besonders hervorzuheben sind dabei *Cardiac Fibrosis*, *Cardiac Necrosis/Cell Death* und *Cardiac Dysfunction*, deren Signifikanzlevel in TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub> sogar unter dem Signifikanzschwellewert von  $-\log_{10}(p\text{-Wert}) = 1,3$  lagen. Betrachtet man weiter die funktionellen Kategorien *Cardiac Damage* und *Heart Failure*, so wurden diese in TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub> gar nicht erst identifiziert, da keinerlei DEGs zugeordnet werden konnten (Abb. 4.12).

Wie zuvor bereits erwähnt wurden 102 DEGs in TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub> und mit 13 DEGs deutlich weniger in TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub> CVD assoziierten funktionellen Kategorien zugeordnet ( $q < 0,05$ ;  $FC \geq |2|$ ), von denen jedoch nur 9 in beiden Vergleichen signifikant reguliert wurden (Abb. 4.13).



**Abb. 4.13: Überschneidung CVD assoziierter DEGs mit signifikant 2facher Expressionsveränderung aufgrund von TAC in Lösungsmittel und Riociguat behandelten Tieren.** Dargestellt ist die Anzahl der DEGs nach Aortenkonstriktion in Lösungsmittel (TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>) und Riociguat (TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub>) behandelten Tieren und deren Schnittmenge. ( $q < 0,05$ ;  $FC \geq |2|$ )

Betrachtet man die zugeordneten DEGs im Detail, zeigt sich, dass die aufgrund der Aortenstenose in TAC-Tieren beobachteten Expressionsveränderungen nicht mehr bzw. stark abgeschwächt in RIO behandelten TAC-Tieren auftraten. Tabelle 4.2 verdeutlicht dies exemplarisch anhand der 20 am stärksten veränderten DEGs mit Bedeutung für CVDs.

**Tabelle 4.2: CVD assoziierte DEGs mit den stärksten Veränderungen aufgrund von TAC.** Die Tabelle zeigt die 20 CVD zugeordneten DEGs mit der stärksten Expressionsänderung nach TAC im Vergleich zur jeweiligen Sham-Gruppe (TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>). Gegenübergestellt sind entsprechende Veränderungen in TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub>. Signifikante Änderungen sind fettgedruckt hervorgehoben ( $q < 0,05$ ).

Entrez ID	Genbeschreibung	Gen ID	TAC <sub>/LM</sub> vs. Sham <sub>/LM</sub>	TAC <sub>/RIO</sub> vs. Sham <sub>/RIO</sub>
			Fold Change	
11459	Actin, alpha 1, skeletal muscle	Acta1	<b>8,75</b>	<b>2,76</b>
18158	Natriuretic peptide type B	Nppb	<b>4,05</b>	<b>2,04</b>
23886	Growth differentiation factor 15	Gdf15	<b>3,87</b>	1,30
140781	Myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta	Myh7	<b>3,80</b>	<b>1,86</b>
11865	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like	Arntl	<b>3,67</b>	1,30
16975	Low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor	Lrp8	<b>3,42</b>	<b>2,35</b>
13717	Elastin	Eln	<b>3,26</b>	1,16
240913	A disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 4	Adamts4	<b>3,14</b>	1,12
223513	Actin-binding Rho activating protein	Abra	<b>3,09</b>	<b>2,10</b>
74053	Glutamate receptor interacting protein 1	Grip1	<b>2,92</b>	1,41
107765	Ankyrin repeat domain 1, cardiac muscle	Ankrd1	<b>2,89</b>	<b>2,27</b>
18124	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	Nr4a3	<b>2,78</b>	-1,06



17885	Myosin, heavy polypeptide 8, skeletal muscle, perinatal	Myh8	<b>2,76</b>	1,31
18787	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	Serpine1	<b>2,76</b>	-1,11
230899	Natriuretic peptide type A	Nppa	<b>2,76</b>	<b>1,77</b>
27279	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a	Tnfrsf12a	<b>2,74</b>	<b>2,02</b>
11657	Albumin	Alb	<b>2,73</b>	1,11
16840	Leukocyte cell derived chemotaxin 1	Lect1	<b>-2,74</b>	-1,29
11829	Aquaporin 4	Aqp4	<b>-2,75</b>	<b>-2,22</b>
18639	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 1	Pfkfb1	<b>-2,86</b>	<b>-1,75</b>

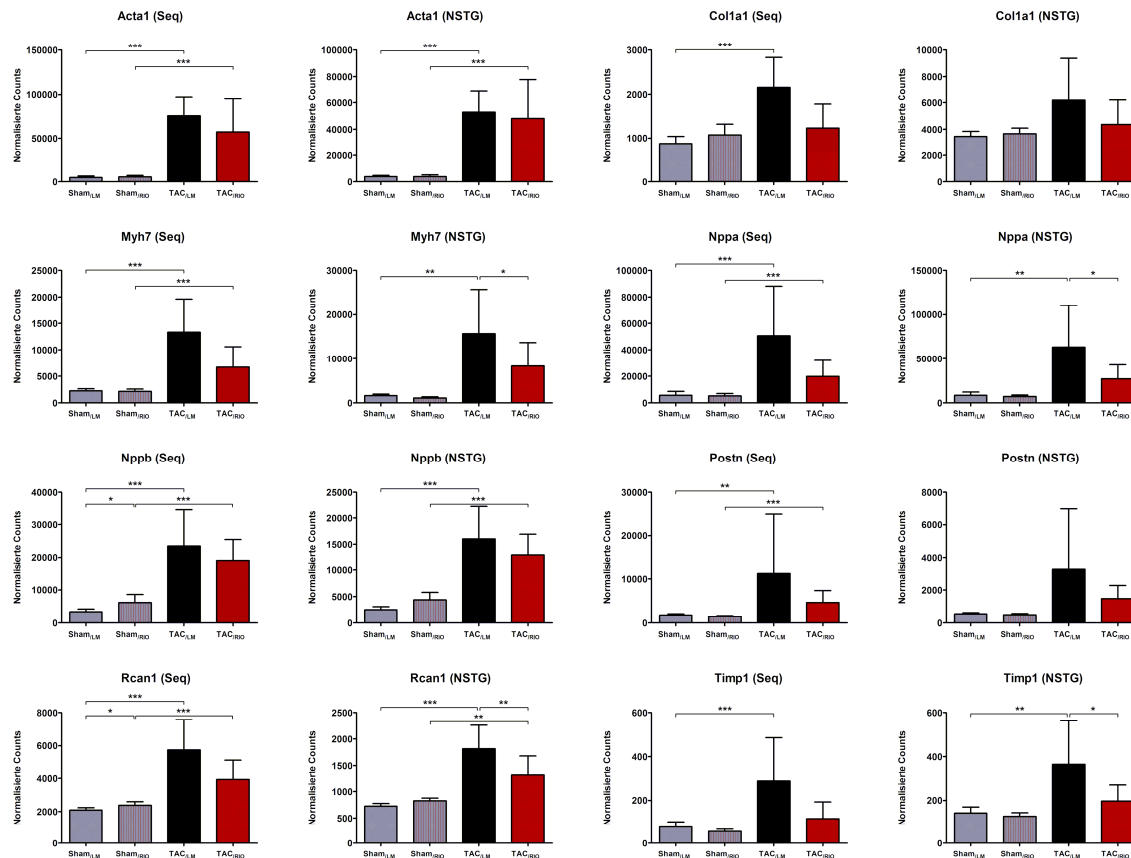
Hervorzuheben sind hierbei besonders bekannte Markergene, die kardialen Stress am deutlichsten kennzeichnen, wie z.B. *Acta1* als Hypertrophiemarker, *Nppa* und *Nppb* als Herzinsuffizienzmarker und *Myh7* und *Ankrd1* als Marker für das fetale Genprogramm. Einige dieser Marker zeigten nach RIO-Behandlung eine um annähernd die Hälfte geringere Expression (*Nppa*, *Nppb*), andere sogar um mehr als die Hälfte (*Acta1*, *Myh7*) im Vergleich zu TAC<sub>/LM</sub>. Weiterhin wurden auch die am NO-sGC-cGMP-Signalweg beteiligten wichtigen Proteingruppen der NO-Synthasen (*Nos1*, *Nos2*, *Nos3*), löslichen Guanylatzyklasen (*Gucy1a1*, *Gucy1b1*; *Gucy1a2*, *Gucy1b2*) und cGMP-abhängigen Proteinkinasen (*Prkg1*, *Prkg2*) näher betrachtet. Nach TAC zeigten *Nos1* und *Nos3* eine signifikante Erhöhung (TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>: *Nos1*, FC = 1,71; *Nos3*, FC = 1,38) und die Untereinheiten der sGC *Gucy1a1* und *Gucy1b1* eine signifikante Verringerung (TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>: *Gucy1a1*, FC = -1,29; *Gucy1b1*, FC = -1,17). Nach RIO-Behandlung wiesen diese Transkripte in TAC-Tieren keine Unterschiede im Vergleich zu Sham-Tieren auf. *Prkg1* (TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub>: FC = 1,33) war in RIO-behandelten TAC-Tieren hingegen signifikant erhöht, sodass insgesamt ein direkter positiver Effekt von RIO auf die Komponenten des NO-sGC-cGMP-Signalweges auf Genexpressionsebene beobachtet wurde.

Eine vollständige Auflistung der DEGs aus der Kategorie CVD ist dem **Anhang S2** zu entnehmen.

### 4.2.3 Validierung der Expressionsdaten mittels NanoString's nCounter® Plattform

Für die Validierung der RNA-Seq Daten wurden einige ausgewählte Gene zusätzlich mittels NanoString's nCounter® Plattform analysiert. Der Fokus lag hierbei auf bekannten herzrelevanten Markergenen, wie *Col1a1*, *Postn*, *Rcan1* und *Timp1*, sowie bereits zuvor erwähnte Marker *Acta1*,

*Myh7*, *Nppa* und *Nppb*. Im Gesamten betrachtet konnten die Ergebnisse aus den RNA-Seq Analysen anhand des ausgewählten Validierungsgensets bestätigt werden. Es zeigten sich gleiche bzw. ähnliche Expressionsmuster der Kandidatengene zwischen beiden Analysemethoden (Abb. 4.14).



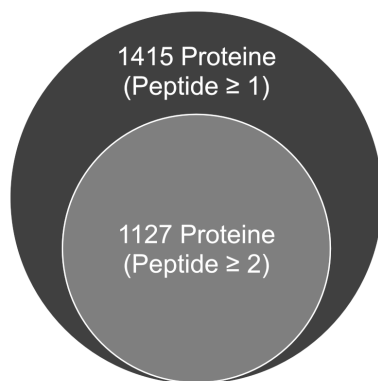
**Abb. 4.14: Validierung der RNA-Seq Daten.** Die Graphen zeigen die linksventrikuläre Expression einiger ausgewählter, CVD assoziierter Zielgene (*Acta1*, *Col1a1*, *Myh7*, *Nppa*, *Nppb*, *Postn*, *Rcan1*, *Timp1*) als normalisierte Counts aus der Illumina® HiSeq® 4000 Sequenzierung (Seq) bzw. der NanoString nCounter® Analyse (NSTG) der verschiedenen Behandlungsgruppen. (n = 6; \*\*\* p < 0,001, \*\* p < 0,01, \* p < 0,05)

Während die beiden Analysemethoden für *Acta1* und *Nppb* fast identische Unterschiede zwischen den vier verschiedenen Behandlungsgruppen zeigten, konnten Expressionsunterschiede für *Col1a1* und *Postn* hingegen nur im Trend mittels NanoString-Validierung bestätigt werden. Im Gegensatz dazu wurden für *Myh7*, *Nppa*, *Rcan1* und *Timp1* sogar noch deutlichere Unterschiede durch die Validierung festgestellt. Hierbei konnten mittels beider Methoden die durch TAC signifikant erhöhten Expressionen identifiziert werden. Während jedoch eine Revertierung bzw. eine Abschwächung dieser Expressionserhöhung nach RIO-Behandlung nur im Trend durch RNA-Seq detektiert wurde, stellte sich dieser Unterschied im NanoString sogar als signifikant im direkten Vergleich von TAC<sub>RIO</sub> vs. TAC<sub>LM</sub> dar (Abb. 4.14). Eine detaillierte Auflistung aller Counts auf Einzelprobenebene aus den RNA-Seq sowie NanoString Analysen ist ebenfalls dem **Anhang S1** (S1-I, S1-II) zu entnehmen.

## 4.3 Einfluss der Riociguat-Behandlung auf das murine linksventrikuläre Proteom nach TAC

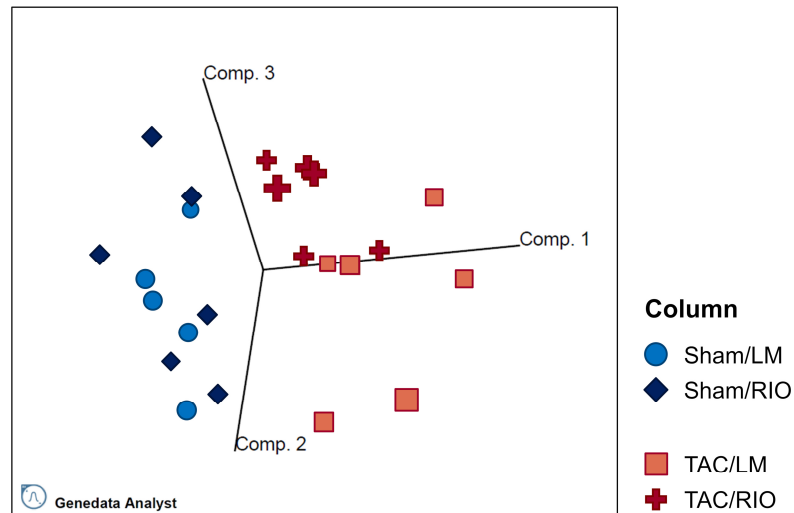
### 4.3.1 Relative Quantifizierung der Unterschiede im Proteom herzinsuffizienter Mäuse mit und ohne Riociguatmedikation

Die Proteinextrakte aller 23 explantierter linken Ventrikel der 4 verschiedenen Behandlungsgruppen (Sham<sub>/LM</sub>, Sham<sub>/RIO</sub>, TAC<sub>/LM</sub>, TAC<sub>/RIO</sub>) wurden nach Proteolyse mittels LTQ-Orbitrap Velos™ Massenspektrometer vermessen. Die erhaltenen massenspektrometrischen Rohdaten wurden anschließend unter Verwendung der MaxQuant Software und deren integrierter Andromeda Suchmaschine weiterverarbeitet und die normalisierten Intensitäten der identifizierten Proteine berechnet. Insgesamt wurden 1415 Proteine identifiziert und quantifiziert. 80% (n = 1127) aller detektierten Proteine wurden mit mindestens 2 oder mehr Peptiden identifiziert (Abb. 4.15).



**Abb. 4.15: Proteinidentifizierung über alle Proben der verschiedenen Behandlungsgruppen hinweg.** Identifiziert wurden insgesamt 1415 Proteine mit mindestens einem Peptid, respektive 1127 mit mindestens 2 Peptiden. (n = 6, außer Sham<sub>/LM</sub>: n = 5)

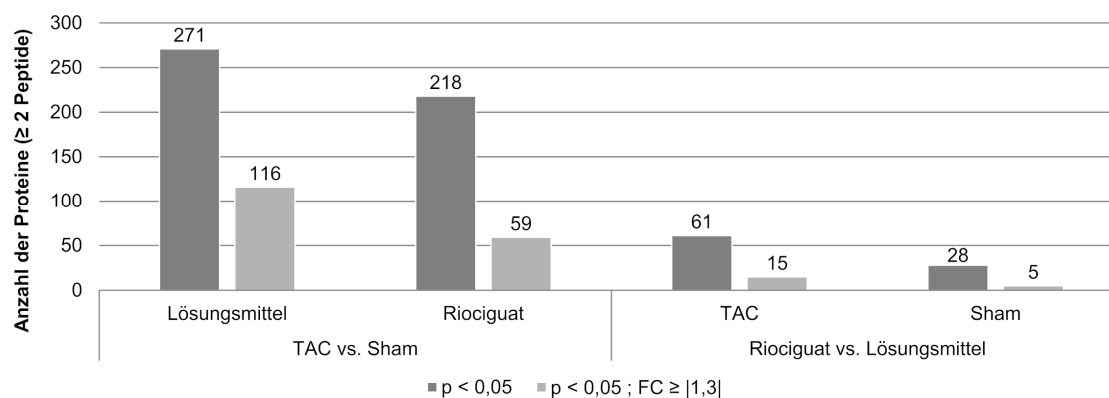
Wie bereits bei den Genexpressionsanalysen wurde ebenfalls eine PCA anhand der Proteomdaten durchgeführt, um einen ersten Eindruck über die Variation innerhalb der Gruppen und die Unterschiede zwischen den vier Gruppen zu gewinnen (Abb. 4.16). Jeder Punkt in der Abbildung stellt dabei ein Tier dar und die verschiedenen Farben zeigen die jeweilige Gruppenzugehörigkeit an. Punkte in unmittelbarer Nähe zueinander deuten auf geringe Gesamtvariation des Proteoms hin. Je weiter die Punkte voneinander entfernt sind, desto mehr unterscheiden sich die einzelnen Proben in ihrer Proteinkomposition.



**Abb. 4.16: Hauptkomponentenanalyse (PCA-Plot) auf Basis aller identifizierten Proteine der verschiedenen Behandlungsgruppen.** Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied sowohl zwischen TAC und Sham operierten Tieren als auch eine distinkte Gruppierung der Behandlungsgruppen innerhalb der TAC-Tiere. (n = 6, außer Sham<sub>/LM</sub>: n = 5)

Diese Hauptkomponentenanalyse zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen dem kardialen Proteom gesunder Sham- und erkrankter TAC-Tiere. Des Weiteren war ebenfalls eine relativ distinkte Gruppierung zwischen Riociguat behandelten und unbehandelten TAC-Tieren zu beobachten. Auf den ersten Blick wirkt deren Verteilung jedoch etwas heterogener und nicht so deutlich voneinander abgegrenzt, wie aus den vorherigen Analysen erwartet. Trotzdem weist dies bereits darauf hin, dass sowohl TAC-OP als auch Riociguatmedikation in TAC-operierten Mäusen zu signifikanten Unterschieden im murinen, linksventrikulären Proteom führten. Ein Unterschied zwischen Sham<sub>/LM</sub> und Sham<sub>/RIO</sub> konnte mittels PCA nicht festgestellt werden (Abb. 4.16).

Für eine relative Quantifizierung wurden wieder Vergleiche zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen herangezogen und näher betrachtet, um zu untersuchen, wie sich die LV Proteinprofile nach TAC und unter RIO-Behandlung veränderten. Auch hierbei lag der Fokus der vergleichenden Analysen einerseits auf den Auswirkungen der TAC-OP auf Tiere mit (TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub>) und ohne Medikation (TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>), andererseits auf dem direkten Einfluss von RIO auf erkrankte (TAC<sub>/RIO</sub> vs. TAC<sub>/LM</sub>) und gesunde (Sham<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>) Tiere. Für alle weiteren Proteomanalysen wurden ausschließlich Proteine berücksichtigt, die mit mindestens 2 Peptiden identifiziert und quantifiziert wurden. Als statistisch signifikant in ihrer Abundanz verändert galten Proteine dabei mit p-Werten kleiner als 0,05. Abbildung 4.17 zeigt die Anzahl aller signifikant veränderten Proteine der verschiedenen Vergleichsgruppen.



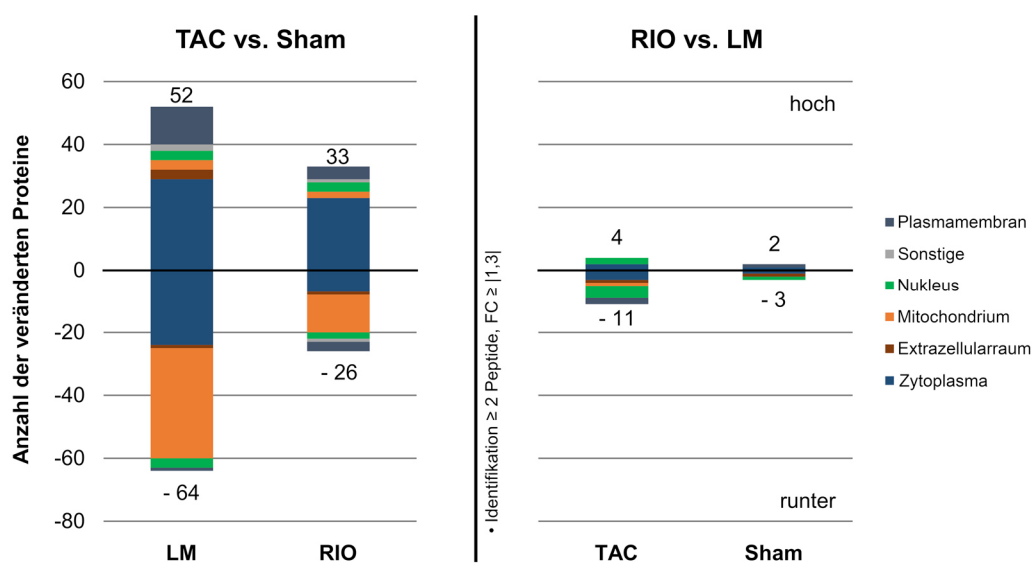
**Abb. 4.17: Anzahl aller signifikant veränderten Proteine der verschiedenen Vergleichsgruppen.** Dargestellt ist die Anzahl in ihrer Abundanz veränderter Proteine innerhalb der angegebenen Signifikanzgrenzen und Vergleichsgruppen. Balken zeigen von links nach rechts folgende Vergleiche: Auswirkungen von TAC in Lösungsmittel behandelten Tieren ( $TAC_{/LM}$  vs.  $Sham_{/LM}$ ), Auswirkungen von TAC in Riociguat behandelten Tieren ( $TAC_{/RIO}$  vs.  $Sham_{/RIO}$ ), Einfluss von Riociguat in TAC-Tieren ( $TAC_{/RIO}$  vs.  $TAC_{/LM}$ ), Einfluss von Riociguat in Sham-Tieren ( $Sham_{/RIO}$  vs.  $Sham_{/LM}$ ).

Diese Analysen ergaben, dass TAC starke Veränderungen der Proteinabundanz verursachte, die nach RIO-Behandlung deutlich reduziert wurden. Die meisten Veränderungen ( $p < 0,05$ ) waren aufgrund der Aortenkonstriktion ohne Behandlung in  $TAC_{/LM}$  vs.  $Sham_{/LM}$  zu beobachten. Insgesamt wiesen hierbei 271 Proteine veränderte Abundanz auf. Weniger Veränderungen waren dagegen in RIO behandelten TAC-Tieren im Vergleich zu RIO behandelten Sham-Tieren zu beobachten ( $n = 218$ ). Die allein auf die RIO-Behandlung zurückzuführenden Veränderungen waren vergleichsweise gering. Interessanterweise zeigte der direkte Vergleich von  $TAC_{/RIO}$  vs.  $TAC_{/LM}$  wie auch auf Genexpressionsebene nur wenige Veränderungen mit insgesamt 61 Proteinen. Die Auswirkungen einer RIO-Behandlung auf gesunde Sham-Tiere bei einem Vergleich von  $Sham_{/RIO}$  vs.  $Sham_{/LM}$  waren am geringsten, mit nur 28 signifikant in ihrer Abundanz veränderten Proteinen. Eine ausführliche Auflistung aller identifizierten Proteine der Proteomanalysen und deren Veränderungen ist dem **Anhang S3** zu entnehmen.

Um die biologische Relevanz besser beurteilen zu können, wurde bei den Proteomanalysen ebenfalls ein weiterer Filter angesetzt, um nur Proteine mit einer mindestens 1,3fachen Abundanzänderung in die weiteren Betrachtungen einzubeziehen ( $p < 0,05$ ;  $FC \geq |1,3|$ ). Diese stringenteren Filterkriterien sollten dazu beitragen, eventuell biologisch wenig relevante und schwache Veränderungen auszuschließen. Danach zeigte sich ein ähnliches Bild, wie oben beschrieben. Die meisten Veränderungen ergaben sich aufgrund von TAC ( $n = 116$ ), gefolgt von einer deutlichen Verringerung in der Proteinanzahl nach RIO-Behandlung ( $n = 59$ ). Sehr wenige bis

verschwindend geringe Proteinveränderungen wurden hingegen bei den direkten Vergleichen einer Medikation in TAC<sub>/RIO</sub> vs. TAC<sub>/LM</sub> (n = 15) und Sham<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub> (n = 5) beobachtet (Abb. 4.17).

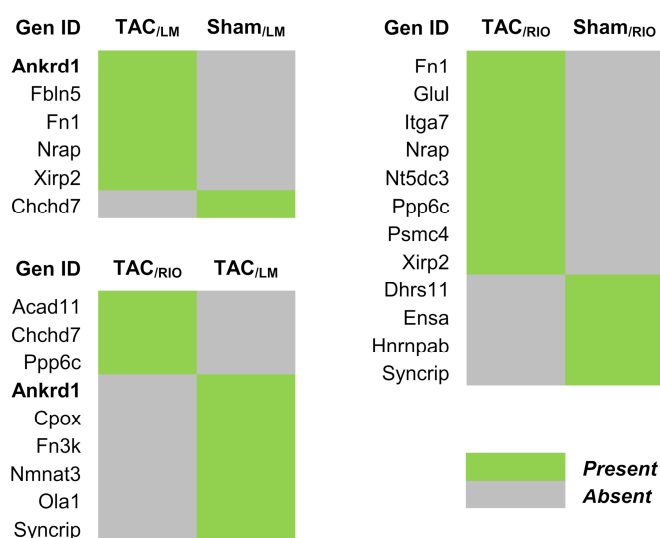
Abbildung 4.18 stellt die Verhältnisse der signifikant veränderten Proteine mit den entsprechend angewendeten Filterkriterien ( $p < 0,05$ ;  $FC \geq |1,3|$ ) der verschiedenen Vergleichsgruppen in Bezug auf die Anzahl von Proteinen mit erhöhter bzw. verringerter Abundanz, zusammen mit deren zellulärer Lokalisation, im Detail dar. Vergleichsweise ähnliche Zahlen wurden an hoch- ( $\uparrow$ ) bzw. herunterregulierten ( $\downarrow$ ) Proteinen nach TAC in LM behandelten (52 $\uparrow$ , 64 $\downarrow$ ) und RIO behandelten (33 $\uparrow$ , 26 $\downarrow$ ) Tieren beobachtet, bei insgesamt weniger Veränderungen auf Proteinebene durch RIO. Der direkte Vergleich der RIO-bedingten Effekte (RIO vs. LM) in TAC- und Sham-Tieren verdeutlicht noch einmal die wenigen Proteinveränderungen aufgrund der Medikation. Proteine, die aufgrund der TAC-OP Abundanzunterschiede aufwiesen, waren sowohl in LM behandelten als auch in RIO behandelten Tieren mehrheitlich im Zytoplasma, in den Mitochondrien bzw. der Plasmamembran lokalisiert.



**Abb. 4.18: Anzahl signifikant veränderter Proteine mit einer mindestens 1,3fachen Abundanzveränderung und deren zellulärer Lokalisation.** Dargestellt ist die Anzahl der Proteine mit  $FC \geq |1,3|$ , deren zellulärer Lokalisation und Auftreten in den verschiedenen Vergleichen. Negative Vorzeichen kennzeichnen die Proteinanzahl mit verringerter Abundanz. Balken zeigen von links nach rechts folgende Vergleiche: Auswirkungen von TAC in Lösungsmittel behandelten Tieren (TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>), Auswirkungen von TAC in Riociguat behandelten Tieren (TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub>), Einfluss von Riociguat in TAC-Tieren (TAC<sub>/RIO</sub> vs. TAC<sub>/LM</sub>), Einfluss von Riociguat in Sham-Tieren (Sham<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>).

Eine detaillierte Zuordnung der zellulären Lokalisation aller identifizierten Proteine ist ebenfalls dem **Anhang S3** zu entnehmen.

Da aufgrund einer relativen Quantifizierung, wie in Abschnitt 3.3.5 beschrieben, bei zu vielen Fehlwerten innerhalb einer Gruppe nicht alle Proteine erfasst werden konnten, wurde ebenfalls eine *absent/present* Analyse mittels Analyst™ durchgeführt. Abbildung 4.19 veranschaulicht das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit von Proteinen innerhalb der vier verschiedenen Behandlungsgruppen in Bezug auf die entsprechenden Gruppenvergleiche. Grün markiert dabei Proteine als vorhanden (*present*), Grau markiert Proteine als nicht vorhanden (*absent*) innerhalb der Behandlungs- und Kontrollgruppen.



**Abb. 4.19: Signifikant als *absent/present* identifizierte Proteine in den verschiedenen Gruppenvergleichen.**

Dargestellt sind Proteine der Gruppenvergleiche TAC/LM vs. Sham/LM, TAC/RIO vs. Sham/RIO und TAC/RIO vs. TAC/LM, die hinsichtlich ihrer Präsenz als signifikant vorhanden ( $p < 0,05$ ) identifiziert wurden. Bei dem Vergleich von Sham/RIO vs. Sham/LM wurden keine Proteine als signifikant vorhanden bzw. abwesend identifiziert. (n = 6, außer Sham/LM: n = 5; Proteinidentifikation  $\geq 2$  Peptide)

Tabelle 4.3 listet die Proteine im Detail und gibt die Anzahl der Proben auf Einzeltierebene der jeweiligen Gruppen wieder, in denen die entsprechenden Proteine identifiziert wurden, zusammen mit den exakten p-Werten aus der *absent/present* Analyse. Insgesamt wurden nur wenige Proteine als *present* bzw. *absent* über die Behandlungs- und Kontrollgruppen identifiziert, wobei der Vergleich von Sham/RIO vs. Sham/LM gar keine Proteine als signifikant *absent/present* in einer der beiden Gruppen ergab. Den interessantesten Befund stellt hierbei *Ankyrin repeat domain-containing protein 1* (ANKRD1) dar. ANKRD1 zeigte sich ausschließlich in TAC/LM in allen sechs LV Proben. In gesunden Sham-Tieren wurde es hingegen in keiner Probe detektiert, unabhängig von deren medikamentöser Behandlung. Interessanterweise wurde es allerdings im direkten Vergleich von TAC/RIO vs. TAC/LM als signifikant abwesend nach Medikation in TAC/RIO identifiziert, respektive

signifikant vorhanden in TAC<sub>/LM</sub> (Abb. 4.19). Genauer betrachtet war ANKRD1 nur in zwei von sechs Proben in TAC<sub>/RIO</sub> vorhanden (Tab. 4.3).

**Tabelle 4.3: Detaillierte Auflistung der Resultate aus der *absent/present* Analyse.** Die Tabelle listet die als signifikant vorhanden identifizierten Proteine der Vergleiche TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>, TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub> und TAC<sub>/RIO</sub> vs. TAC<sub>/LM</sub> auf. Bei dem Vergleich von Sham<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub> wurden keine Proteine als signifikant vorhanden bzw. abwesend identifiziert. (n = 6, außer Sham<sub>/LM</sub>: n = 5; Proteinidentifikation ≥ 2 Peptide)

<i>Vergleich von TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub></i>					
Gen ID	UniProt ID	Proteinbeschreibung	vorhanden in TAC/LM	vorhanden in Sham/LM	p-Wert
Ankrd1	Q9CR42	Ankyrin repeat domain-containing protein 1	6	0	0,00
Fbln5	Q9WVH9	Fibulin-5	6	1	0,02
Fn1	P11276	Fibronectin	6	1	0,02
Nrap	Q80XB4	Nebulin-related-anchoring protein	6	0	0,00
Xirp2	Q4U4S6	Xin actin-binding repeat-containing protein 2	6	1	0,02
Chchd7	Q8K2Q5	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 7	2	5	0,04

<i>Vergleich von TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub></i>					
Gen ID	UniProt ID	Proteinbeschreibung	vorhanden in TAC/RIO	vorhanden in Sham/RIO	p-Wert
Fn1	P11276	Fibronectin	5	0	0,01
Glul	P15105	Glutamine synthetase	4	0	0,03
Itga7	Q61738	Integrin alpha-7	5	1	0,04
Nrap	Q80XB4	Nebulin-related-anchoring protein	6	1	0,01
Nt5dc3	Q3UHB1	5-nucleotidase domain-containing protein 3	4	0	0,03
Ppp6c	Q9CQR6	Serine/threonine-protein phosphatase 6 catalytic subunit	4	0	0,03
Psmc4	P54775	26S protease regulatory subunit 6B	6	2	0,03
Xirp2	Q4U4S6	Xin actin-binding repeat-containing protein 2	6	2	0,03
Dhrs11	Q3U0B3	Dehydrogenase/reductase SDR family member 11	1	5	0,04
Ensa	P60840	Alpha-endosulfine	2	6	0,03
Hnrnpab	Q99020	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	1	6	0,01
Syncrip	Q7TMK9	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	1	5	0,04



Vergleich von  $TAC_{RIO}$  vs.  $TAC_{LM}$ 

Gen ID	UniProt ID	Proteinbeschreibung	vorhanden in TAC/RIO	vorhanden in TAC/LM	p-Wert
Acad11	Q80XL6	Acyl-CoA dehydrogenase family member 11	4	0	0,03
Chchd7	Q8K2Q5	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 7	6	2	0,03
Ppp6c	Q9CQR6	Serine/threonine-protein phosphatase 6 catalytic subunit	4	0	0,03
Ankrd1	Q9CR42	Ankyrin repeat domain-containing protein 1	2	6	0,03
Cpox	P36552	Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, mitochondrial	0	5	0,01
Fn3k	Q9ER35	Fructosamine-3-kinase	0	4	0,03
Nmnat3	Q99JR6	Nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase 3	2	6	0,03
Ola1	Q9CZ30	Obg-like ATPase 1	2	6	0,03
Syncrip	Q7TMK9	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	1	5	0,04

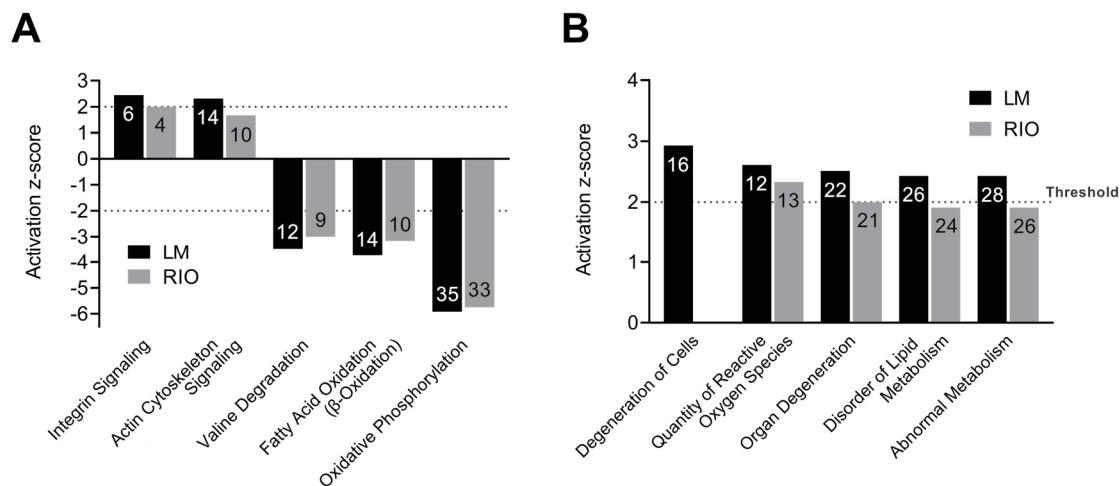
Eine detaillierte Zuordnung der *absent/present* Analysen für alle identifizierten Proteine ist ebenfalls dem **Anhang S3** zu entnehmen.

### 4.3.2 Funktionelle Klassifizierung der veränderten Proteine

Wie bereits in Abschnitt 4.2.2 beschrieben, erfolgte auch für die veränderten Proteine eine funktionelle Klassifizierung unter Verwendung der Software und Datenbank Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®). Da die direkten Gruppenvergleiche zur Auswirkung einer Riociguatbehandlung auf das linksventrikuläre Proteom in TAC- und Sham-Tieren nur wenige Veränderungen aufwiesen (Abb. 4.17 und 4.18), wurden für weitere Analysen auch hierbei oftmals nur die Vergleiche von  $TAC_{LM}$  vs.  $Sham_{LM}$  und  $TAC_{RIO}$  vs.  $Sham_{RIO}$  gegenübergestellt und für nähere Betrachtungen herangezogen.

Eine IPA®-Analyse aller signifikant veränderten Proteine ( $p < 0,05$ ) der verschiedenen Vergleichsgruppen gab Aufschluss über die am stärksten beeinflussten Signalwege und biologischen Prozesse hinsichtlich ihrer Aktivierung oder Inhibierung (Abb. 4.20). Wie bereits im Abschnitt der Genexpressionsanalysen beschrieben, war die TAC-induzierte Drucküberlastung

(TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>) auch auf Proteinebene besonders mit der Aktivierung von gewebe- und zellstrukturspezifischen Signalwegen, wie *Integrin* und *Actin Cytoskeleton Signaling* assoziiert. Des Weiteren zeigten sich Signalwege des Energiemetabolismus, wie *Fatty Acid Oxidation* ( $\beta$ -Oxidation) und *Oxidative Phosphorylation*, als signifikant inhibiert (Abb. 4.20A). Verschiedene negativ konnotierte biologische Prozesse zeigten sich ebenfalls als signifikant aktiviert aufgrund von TAC, wie z. B. *Degeneration of Cells*, *Organ Degeneration* und *Abnormal Metabolism* (Abb. 4.20B).

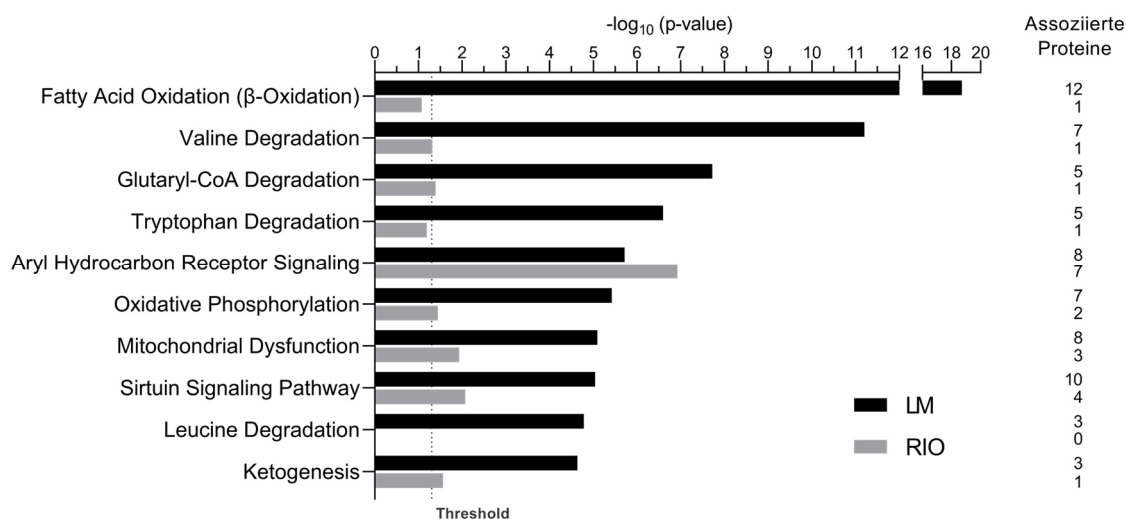


**Abb. 4.20: Analyse aller signifikant veränderten Proteine der verschiedenen Vergleichsgruppen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Aktivität von Signalwegen und biologischen Prozessen.** Eine Analyse der beeinflussten Signalwege (A) und biologischen Prozesse (B) wurde für alle signifikant veränderten Proteine der verschiedenen Vergleichsgruppen durchgeführt ( $p < 0,05$ ). Z-Scores verdeutlichen die Ausrichtung der vorhergesagten Regulation, wobei ein z-Score  $\geq 2$  eine signifikante Aktivierung des Signalweges und ein z-Score  $\leq -2$  eine signifikante Inhibierung anzeigt. Zahlen innerhalb der Balken geben die Anzahl der zugeordneten Proteine an. (LM: Lösungsmittelgabe; RIO: Riociguatmedikation; Proteinidentifikation  $\geq 2$  Peptide)

Nach einer Behandlung mit RIO zeigten die eben beschriebenen Signalwege und Prozesse schwächere z-Scores und damit eine Abschwächung der jeweiligen Aktivierung oder Inhibierung nach TAC. Auch wenn diese Abschwächung nicht sehr stark ausgeprägt war, so zeigte z.B. *Integrin Signaling* eine deutliche Abnahme der Aktivierung. *Valine Degradation*, *Fatty Acid Oxidation* ( $\beta$ -Oxidation) und *Oxidative Phosphorylation* zeigten hingegen eine Abschwächung in deren Inhibierung. Die prädizierte Aktivierung von *Actin Cytoskeleton Signaling* sank sogar unter die Signifikanzschwelle (Abb. 4.20A). Bei den am stärksten durch TAC beeinflussten biologischen Prozessen zeigte sich überall eine Verringerung der Aktivierung, wobei *Disorder of Lipid Metabolism* und *Abnormal Metabolism* ebenfalls keinen signifikanten z-Score  $\geq 2$  erreichten. Für die Kategorie *Degeneration of Cells* konnten nach einer RIO-Behandlung in TAC-Tieren (TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub>) keine abundanzveränderten Proteine zugeordnet werden (Abb. 4.20B). Ebenfalls konnte damit

einhergehend mehrheitlich eine verringerte Anreicherung der Proteine in den dargestellten funktionellen Kategorien beobachtet werden (Abb. 4.20A+B).

Nachfolgend wurde eine Analyse der signifikant veränderten Proteine mit einer Änderung von  $FC \geq |1,3|$  aufgrund der TAC-OP in Lösungsmittel und Riociguat behandelten Tieren durchgeführt, um die Signalwege mit der stärksten biologischen Relevanz (TOP10) zu identifizieren. Die höchste Signifikanz und die größte Anzahl an Proteinen waren bei einem Vergleich von  $TAC_{LM}$  vs.  $Sham_{LM}$  für Signalwege der Energieproduktion und des Energiemetabolismus (*Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation*, *Glutaryl-CoA Degradation*, *Tryptophan Degradation*, *Ketogenesis*, *Oxidative Phosphorylation*), gefolgt von *Pathways* des Aminosäureabbaus/-metabolismus (*Valine Degradation*, *Tryptophan Degradation*, *Leucine Degradation*) zu verzeichnen (Abbildung 4.21). Als Signalgeber für oxidativen Stress war ebenfalls die Kategorie *Mitochondrial Dysfunction* hervorgehoben.

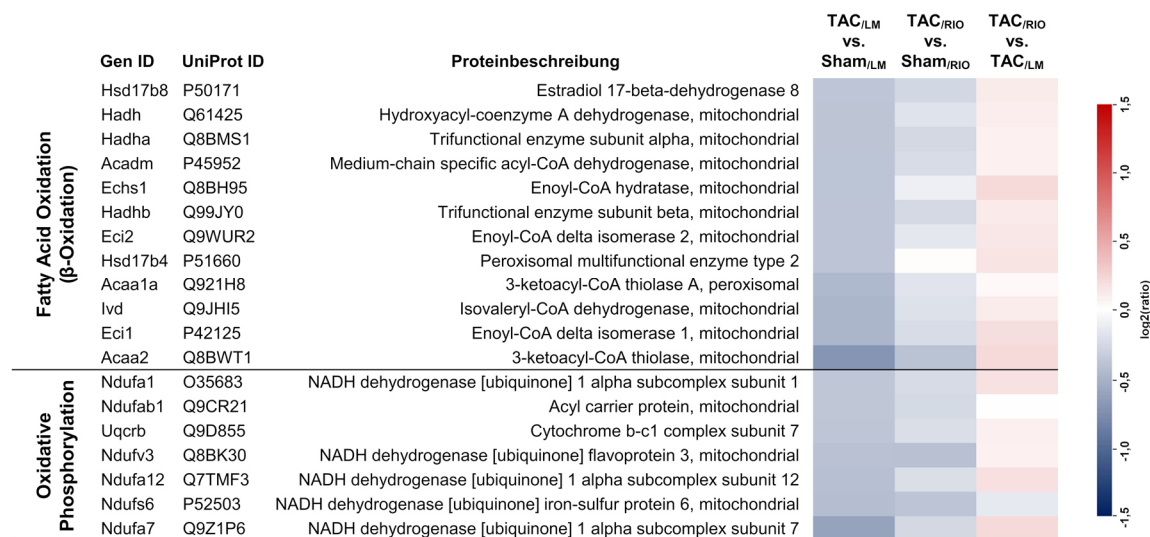


**Abb. 4.21: TOP10 Canonical Pathways mit signifikanter Anreicherung veränderter Proteine aufgrund von TAC in Lösungsmittel und Riociguat behandelten Tieren.** Das Balkendiagramm stellt die Signifikanz der Überrepräsentation der funktionellen Signalwege als negative log-transformierte p-Werte dar. Abgebildet sind die 10 am stärksten beeinflussten Signalwege von  $TAC_{LM}$  und  $TAC_{RIO}$  im Vergleich zu deren Sham-Kontrollgruppe, zusammen mit der Anzahl assoziierter Proteine mit signifikanter Abundanzänderung ( $p < 0,05$ ;  $FC \geq |1,3|$ ). (LM: Lösungsmittelgabe; RIO: Riociguatmedikation)

Betrachtet man nun dem gegenübergestellt die Auswirkungen einer RIO-Behandlung auf die TOP10 Signalwege nach TAC ohne medikamentöse Behandlung, zeigt sich sehr deutlich, dass die Repräsentation dieser Signalwege im indirekten Vergleich zwischen  $TAC_{LM}$  und  $TAC_{RIO}$  zu ihren entsprechenden Sham-Kontrollgruppen wieder massiv verringert war. Mit der Reduktion der Anzahl signifikant regulierter Proteine in den betreffenden Kategorien ging ebenfalls eine deutlich niedrigere

Signifikanz der entsprechenden Kategorien einher. Einige der Stoffwechselwege, wie z.B. *Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation* erreichten nicht einmal mehr die Signifikanzschwelle mit einem  $-\log_{10}(\text{p-Wert})$  von 1,3 (Abb. 4.21).

Ein genauerer Blick auf Proteinebene veranschaulicht die Änderungen in der Abundanz der jeweiligen Proteine aufgrund von TAC und den Effekt einer RIO-Behandlung. Abbildung 4.22 zeigt die durch TAC in unbehandelten Tieren ( $\text{TAC}_{/LM}$  vs.  $\text{Sham}_{/LM}$ ) signifikant veränderten Proteine ( $p < 0,05$ ;  $\text{FC} \geq |1,3|$ ) in wichtigen Signalwegen des Energiemetabolismus (*Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation*, *Oxidative Phosphorylation*). Unabhängig vom Signifikanzniveau sind diesen Ergebnissen die Werte der weiteren Vergleichsgruppen  $\text{TAC}_{/RIO}$  vs.  $\text{Sham}_{/RIO}$  und  $\text{TAC}_{/RIO}$  vs.  $\text{TAC}_{/LM}$  gegenübergestellt. Eine Rotfärbung kennzeichnet dabei eine Zunahme, eine Blaufärbung eine Abnahme der jeweiligen Proteinabundanz.

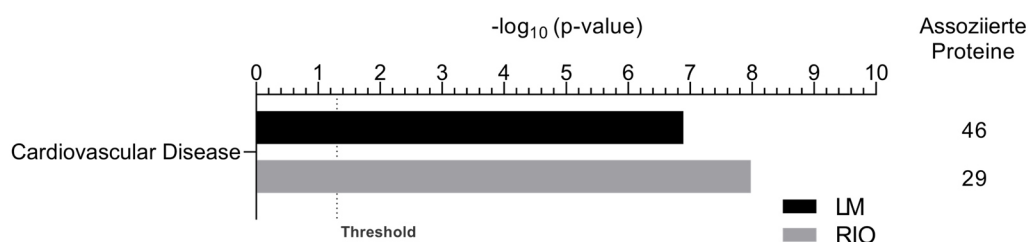


**Abb. 4.22: Veränderungen von Proteinen der Kategorien *Fatty Acid Oxidation* ( $\beta$ -Oxidation) und *Oxidative Phosphorylation* durch TAC bzw. Medikation.** Dargestellt sind die aufgrund von TAC ( $\text{TAC}_{/LM}$  vs.  $\text{Sham}_{/LM}$ ) signifikant veränderten Proteine ( $p < 0,05$ ;  $\text{FC} \geq |1,3|$ ) der o.g. Kategorien im Vergleich zur Regulation durch die RIO-Behandlung (indirekter Vergleich:  $\text{TAC}_{/RIO}$  vs.  $\text{Sham}_{/RIO}$ ; direkter Vergleich:  $\text{TAC}_{/RIO}$  vs.  $\text{TAC}_{/LM}$ ). Änderungen in der Proteinabundanz sind als  $\log_2$ -Ratios angegeben. Rotfärbung kennzeichnet eine Zunahme, Blaufärbung eine Abnahme der Abundanz.

Als Erstes fiel eine deutliche Abnahme der Abundanz der den Kategorien zugehörigen Proteine in den erkrankten Tieren ( $\text{TAC}_{/LM}$ ,  $\text{TAC}_{/RIO}$ ) im Vergleich zu Sham auf. Allerdings war die Abnahme generell nicht sehr stark. Selbst die beiden am stärksten veränderten Proteine *3-ketoacyl-CoA thiolase* (ACAA2) und *NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 7* (NDUFA7) zeigten nur einen ca. 1,6fachen Unterschied. Betrachtet man nun die zweite und dritte Farbsäule in Abbildung 4.22, so werden abschwächende bzw. revertierende Effekte einer RIO-Behandlung

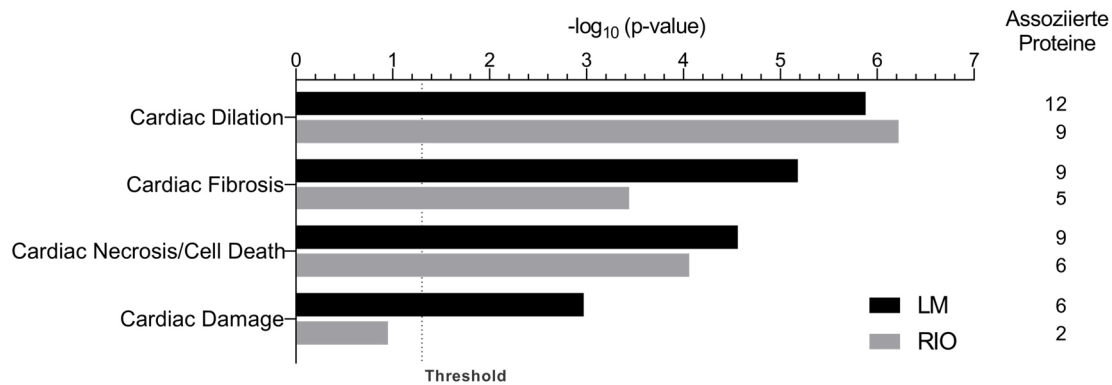
deutlich. Der indirekte Vergleich zu  $TAC_{/RIO}$  vs.  $Sham_{/RIO}$  zeigte wesentlich schwächere Unterschiede als der Vergleich zwischen unbehandelten TAC- und Sham-Tieren. Die Effekte, die aufgrund von TAC beobachtet wurden, waren nach TAC durch RIO-Medikation nicht mehr so stark ausgeprägt. Der direkte Vergleich des Einflusses von RIO auf erkrankte Tiere ( $TAC_{/RIO}$  vs.  $TAC_{/LM}$ ) unterstreicht diese Beobachtung ebenfalls. So wurde für alle Proteine mit Ausnahme von *NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6* (NDUFS6) eine inverse Regulation und damit eine, wenn auch schwache, Zunahme der Proteinmengen verzeichnet (Abb. 4.22).

Eine Zuordnung zur IPA® Kategorie der kardiovaskulären Erkrankungen (CVD, *Cardiovascular Diseases*) erfolgte, wie bereits zuvor bei der Genexpressionsanalyse (Abschnitt 4.2.2), auch für die quantifizierten Proteine ( $p < 0,05$ ;  $FC \geq |1,3|$ ). Für beide Gruppenvergleiche ( $TAC_{/LM}$  vs.  $Sham_{/LM}$ ,  $TAC_{/RIO}$  vs.  $Sham_{/RIO}$ ) ergab sich eine signifikante Anreicherung veränderter Proteine innerhalb dieser Kategorie. Jedoch zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Anzahl der zugeordneten Proteine aufgrund der RIO-Behandlung nach TAC. In  $TAC_{/LM}$  vs.  $Sham_{/LM}$  wurden 46 Proteine, dagegen in  $TAC_{/RIO}$  vs.  $Sham_{/RIO}$  nur noch 29 Proteine funktionell zu CVDs zugeordnet (Abb. 4.23).



**Abb. 4.23: Zuordnung der aufgrund von TAC in Lösungsmittel und Riociguat behandelten Tieren signifikant veränderten Proteine zu kardiovaskulären Erkrankungen.** Das Balkendiagramm stellt die Signifikanz der Überrepräsentation der funktionellen Kategorie als negative log-transformierte p-Werte dar. Abgebildet ist die Oberkategorie der kardiovaskulären Erkrankungen (CVD) für  $TAC_{/LM}$  und  $TAC_{/RIO}$  im Vergleich zu deren Sham-Kontrollgruppe, zusammen mit der Anzahl der zugeordneten Proteine ( $p < 0,05$ ;  $FC \geq |1,3|$ ). (LM: Lösungsmittelgabe; RIO: Riociguatmedikation)

Abbildung 4.24 zeigt wichtige, wesentliche Kardiotoxizitätsfunktionen, die CVD assoziierte klinische bzw. pathologische Endpunkte und Phänotypen im Detail beschreiben. Dargestellt sind hierbei die am stärksten überrepräsentierten Kategorien in  $TAC_{/LM}$  vs.  $Sham_{/LM}$  im Vergleich zu  $TAC_{/RIO}$  vs.  $Sham_{/RIO}$ , zusammen mit der Anzahl der zugeordneten Proteine.



**Abb. 4.24: Eminente Kardiotoxizitätsfunktionen mit signifikanter Anreicherung von veränderten Proteinen aufgrund von TAC in Lösungsmittel und Riociguat behandelten Tieren.** Das Balkendiagramm stellt die Signifikanz der Überrepräsentation der funktionellen Kategorie als negative log-transformierte p-Werte dar. Abgebildet sind die CVD assoziierten Signalwege mit der stärksten Anreicherung von regulierten Proteinen in TAC<sub>/LM</sub> und TAC<sub>/RIO</sub> im Vergleich zu deren Sham-Kontrollgruppe, zusammen mit der Anzahl der zugeordneten Proteine ( $p < 0,05$ ;  $FC \geq |1,3|$ ). (LM: Lösungsmittelgabe; RIO: Riociguatmedikation)

Beide Gruppenvergleiche verzeichneten die signifikanteste Anreicherung von veränderten Proteinen in der Kategorie *Cardiac Dilatation*. Ein Unterschied zeigte sich allerdings wieder in der Anzahl der zugeordneten Proteine. In TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub> wurden 12 Proteine, dagegen in TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub> nur noch 9 Proteine zugeordnet. Für die weiteren Kardiotoxizitätsfunktionen *Cardiac Fibrosis*, *Cardiac Necrosis/Cell Death* und *Cardiac Damage* zeigte sich ebenfalls nach RIO-Behandlung in TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub> eine geringere Zahl zugeordneter Proteine im Vergleich zu TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub> und damit einhergehend eine Abnahme der Signifikanz der Anreicherung. Hervorzuheben ist die Kategorie *Cardiac Damage*, welche nach RIO-Behandlung mit nur noch 2 assoziierten Proteinen die Signifikanzschwelle von  $-\log_{10}(p\text{-Wert}) = 1,3$  nicht mehr erreichte (Abb. 4.24).

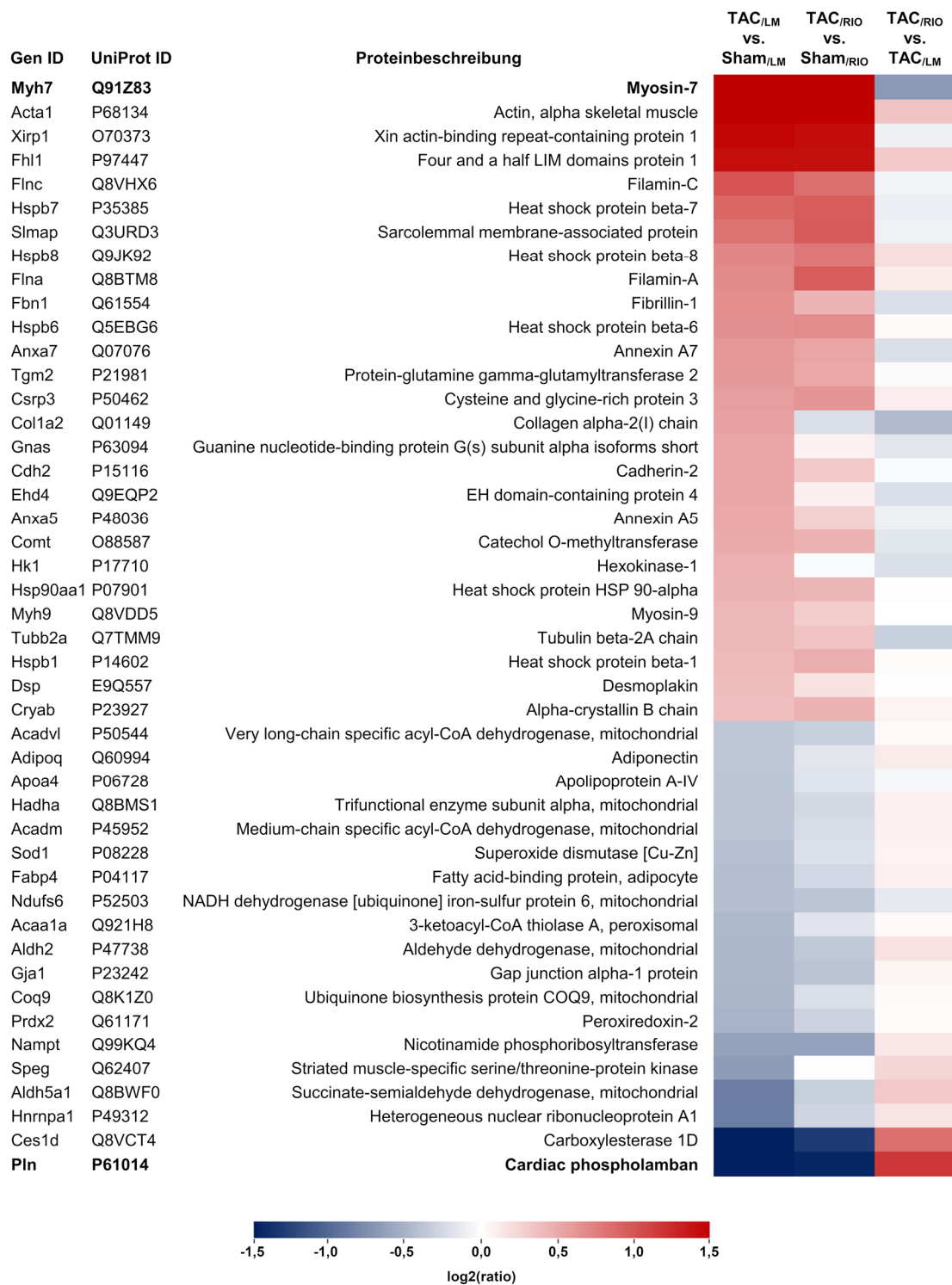
Anreicherungsanalysen geben nur begrenzt Auskunft über die Regulationsrichtung und Aktivität bestimmter Signalwege, Funktionen und Prozesse unter einer bestimmten Behandlung. Ein detaillierterer Blick auf einzelne Proteine bzw. Proteinklassen veranschaulicht ihre Änderungen aufgrund von TAC und den Effekt einer RIO-Behandlung. So zeigt die nachfolgende Abbildung 4.25 die durch TAC in unbehandelten Tieren (TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>) signifikant veränderten Proteine ( $p < 0,05$ ;  $FC \geq |1,3|$ ), die als relevant für CVDs angesehen werden. Unabhängig vom Signifikanzniveau sind die Werte der weiteren Vergleichsgruppen TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub> und TAC<sub>/RIO</sub> vs. TAC<sub>/LM</sub> gegenübergestellt. Von den insgesamt 46 veränderten Proteinen wiesen 27 erhöhte ( $\uparrow$ ) und 19 verringerte ( $\downarrow$ ) Abundanzen in Lösungsmittel behandelten TAC-Tieren im Vergleich zu deren Sham-Kontrollgruppe auf. Die stärksten Veränderungen zeigten dabei

Myosin-7 (MYH7 $\uparrow$ ) und kardiales Phospholamban (PLN $\downarrow$ ). Wie bereits anhand der vorangegangenen Analysen zu sehen war, stellten vor allem mitochondriale Proteine, wie z.B. *NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6* (NDUFS6 $\downarrow$ ), *Trifunctional enzyme subunit alpha* (HADHA $\downarrow$ ), *Ubiquinone biosynthesis protein COQ9* (COQ9 $\downarrow$ ) und verschiedene Dehydrogenasen (ACADM $\downarrow$ , ACADVL $\downarrow$ , ALDH2 $\downarrow$ , ALDH5A1 $\downarrow$ ), den Großteil der Proteine dar, die nach TAC verringert waren. Zytoskelettale Proteine, wie *Actin, alpha skeletal muscle* (ACTA1 $\uparrow$ ), *Cysteine and glycine-rich protein 3* (CSR3 $\uparrow$ ), *Desmoplakin* (DSP $\uparrow$ ), *Tubulin beta-2A chain* (TUBB2A $\uparrow$ ) und *Xin actin-binding repeat-containing protein 1* (XIRP1 $\uparrow$ ), aber auch Proteine der extrazellulären Matrix (ECM), wie *Collagen alpha-2(I) chain* (COL1A2 $\uparrow$ ) und *Fibrillin-1* (FBN1 $\uparrow$ ), nahmen hingegen zu. Als wichtige Anzeiger für zellulären Stress sollen an dieser Stelle auch fünf Hitzeschockproteine erwähnt werden, namentlich *Heat shock protein beta-1, -6, -7, -8* (HSPB1 $\uparrow$ , HSPB6-8 $\uparrow$ ) und *Heat shock protein HSP 90-alpha* (HSP90AA1 $\uparrow$ ), die ebenfalls nach TAC hochreguliert waren.

Eine Behandlung mit RIO hatte für die CVD assoziierten Proteine einen abschwächenden Effekt auf die Veränderungen nach TAC, auch wenn dies nicht für alle Proteine zutraf (Abb. 4.25, TAC<sub>RIO</sub> vs. Sham<sub>RIO</sub>). Diese Abschwächung bzw. Revertierung wird deutlicher im direkten Vergleich von TAC<sub>RIO</sub> vs. TAC<sub>LM</sub>. Bereits erwähntes MYH7 und PLN zeigten nicht nur die stärksten Veränderungen durch TAC, sie wiesen auch die stärkste inverse Regulation nach RIO auf. So war die erhöhte Menge von MYH7 um fast ein Viertel gesenkt und die verringerte Menge von PLN um mehr als die Hälfte erhöht. Von den erwähnten zytoskelettalen und ECM-Proteinen zeigten unter anderem DSP und COL1A2 eine deutliche Reduktion nach RIO, bei den erwähnten mitochondrialen Proteinen besonders ACADM, ALDH5A1 und COQ9 eine Zunahme.

Eine detaillierte Auflistung der CVD assoziierten Proteine ist dem **Anhang S4** zu entnehmen.





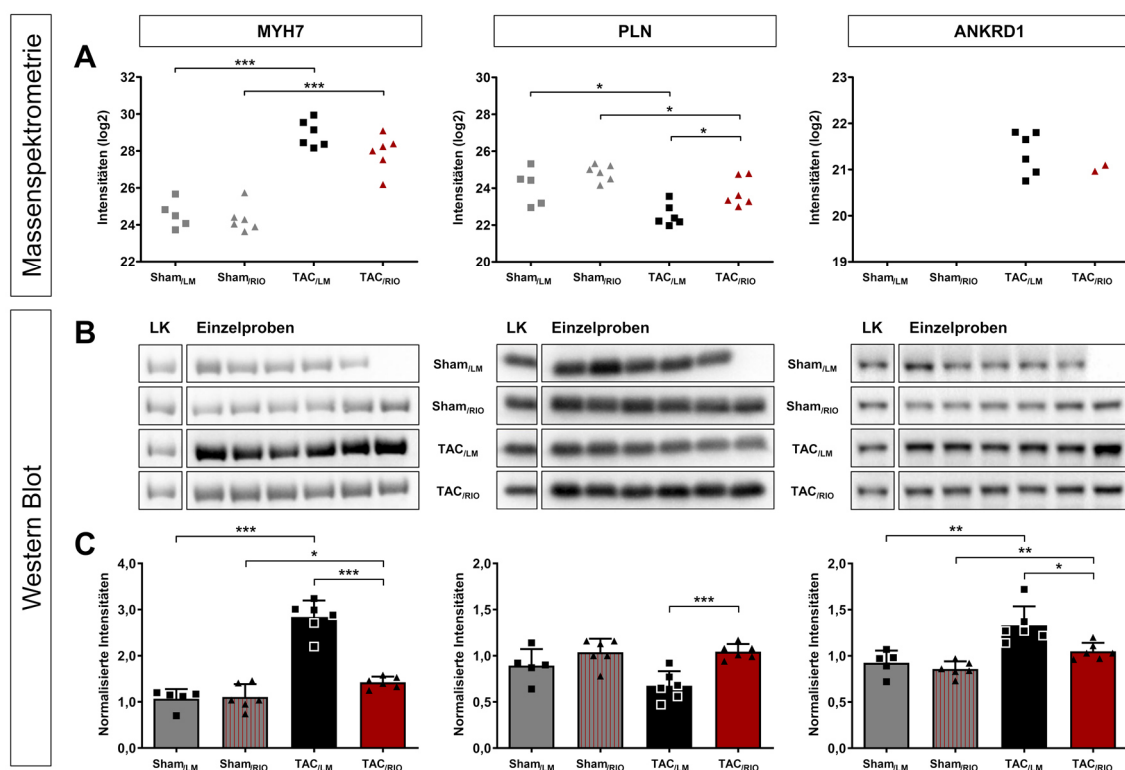
**Abb. 4.25: Heatmap signifikant veränderter Proteine mit Assoziation zu kardiovaskulären Erkrankungen (CVD).**

Dargestellt sind die aufgrund von TAC (TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>) signifikant veränderten Proteine ( $p < 0,05$ ; FC  $\geq 1,3$ ) im Vergleich zur Regulation durch die RIO-Behandlung (indirekter Vergleich: TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub>; direkter Vergleich: TAC<sub>/RIO</sub> vs. TAC<sub>/LM</sub>). Änderungen in der Proteinabundanz sind als log<sub>2</sub>-Ratios angegeben. Rotfärbung kennzeichnet eine Zunahme, Blaufärbung eine Abnahme der Abundanz.



### 4.3.3 Analyse und Validierung der Proteomdaten mittels Western Blot

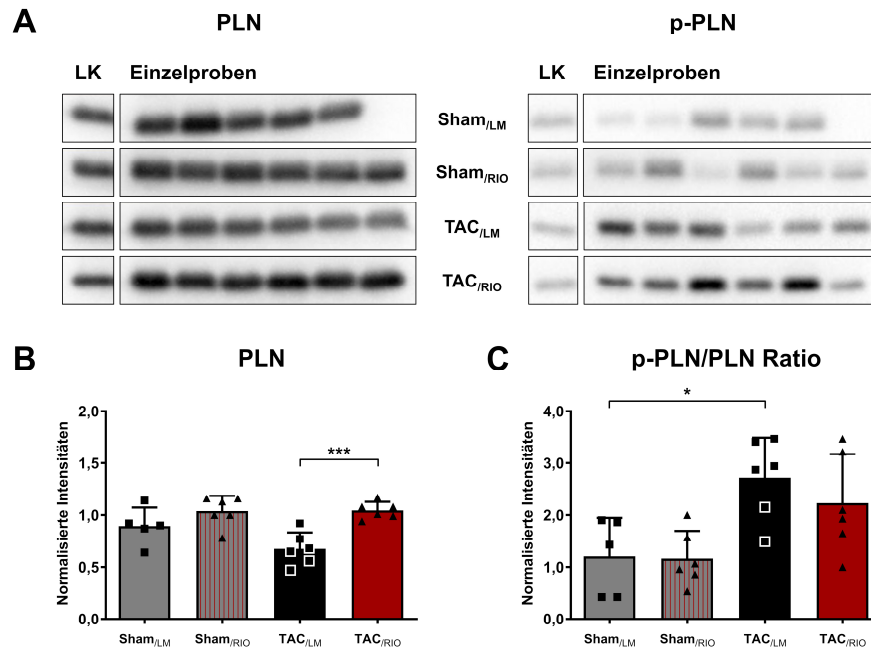
Für die Validierung der Proteomdaten wurden einige ausgewählte Protein-Targets mittels Western Blot Analysen (WB) untersucht. Der Fokus lag hierbei auf bekannten herzrelevanten Markern, für die die massenspektrometrischen Daten auf besonders starke Unterschiede in den Gruppen hinwiesen. Zum einen waren das MYH7 und PLN, die gleichzeitig die stärksten Veränderungen nach TAC und die stärkste Gegenregulation durch RIO aufwiesen. Zum anderen war das ANKRD1, welches durch eine *absent/present* Analyse auffiel, da es scheinbar in Folge von TAC induziert wurde und nach RIO-Behandlung wieder unter die Detektionsschwelle sank. Insgesamt konnten die Ergebnisse dieser drei Proteine aus den Proteomanalysen bestätigt werden. Es zeigten sich gleiche bzw. ähnliche Proteinmuster dieser Marker unabhängig von der Analysemethode (Abb. 4.26). Der obere Teil der Abbildung stellt die Intensitäten der MS/MS-Analysen (Abb. 4.26A) denen der WB-Analysen (Abb. 4.26C) im unteren Teil gegenüber.



**Abb. 4.26: Validierung relevanter und repräsentativer Herzinsuffizienzmarker aus den MS-Analysen mittels Western Blot. (A)** Normalisierte und log<sub>2</sub>-transformierte Intensitäten der MS-Analysen. **(B)** Western Blot Signale (LK: Ladekontrolle aus gepoolter Probe von Sham<sub>LM</sub>). **(C)** Auf Gesamtprotein normalisierte Intensitäten der Western Blot Analyse. Balken stellen Mittelwerte + SD dar. (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ;  $n = 6$ , außer Sham<sub>LM</sub>:  $n = 5$ ; MYH7: Myosin-7; PLN: Phospholamban; ANKRD1: *Ankyrin repeat domain-containing protein 1*)

Für MYH7 wurden fast identische Änderungen anhand der MS/MS- und WB-Analysen beobachtet. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung nach TAC im Vergleich zur entsprechenden Sham-Kontrollgruppe, sowohl in RIO behandelten als auch in unbehandelten Tieren. Jedoch ging die MYH7-Menge durch die Medikation in TAC<sub>/RIO</sub> deutlich zurück. Was anhand der massenspektrometrischen Intensitäten nur im Trend zu sehen war (Abb. 4.26A), zeigte sich mittels Western Blot als deutlich signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) im direkten Vergleich zwischen TAC<sub>/RIO</sub> und TAC<sub>/LM</sub> (Abb. 4.26C). PLN wurde mittels Massenspektrometrie hingegen mit signifikant verringerten Intensitäten nach TAC im Vergleich zur entsprechenden Sham-Kontrollgruppe detektiert, wieder unabhängig von der Medikation und abgeschwächt in TAC<sub>/RIO</sub>. Zusätzlich zeigte der Vergleich zwischen TAC<sub>/RIO</sub> und TAC<sub>/LM</sub> signifikante Unterschiede. Dieser signifikante Unterschied aus den MS/MS-Analysen im direkten Vergleich von behandelten und unbehandelten Tieren konnte ebenfalls mittels WB bestätigt werden, wohingegen die Verminderung nach TAC nur im Trend beobachtet wurde. ANKRD1 wurde mittels MS in jeder einzelnen Probe der TAC<sub>/LM</sub>-Gruppe identifiziert, jedoch nur in zwei Proben der behandelten TAC<sub>/RIO</sub>-Gruppe und in den Sham-Proben war die Menge generell unter der Detektionsgrenze. Die detektierten WB-Intensitäten stehen trotzdem im Einklang mit den Ergebnissen der MS/MS-Analysen. Im WB zeigte sich ANKRD1 signifikant durch TAC erhöht, ähnlich wie bei MYH7 sowohl mit als auch ohne Behandlung. Der Vergleich von TAC<sub>/RIO</sub> und TAC<sub>/LM</sub> zeigt jedoch eine Abnahme der ANKRD1-Menge. Durch die relativ große Menge an eingesetztem Probenmaterial (50 µg) für die 1D-PAGE und WB und die hohe Sensitivität von Antikörpern und Detektionsreagenzien ist es möglich, auch sehr geringe basale Proteinlevel dieses kardialen Stressmarkers zu detektieren, wohingegen niedrig abundante Proteine mittels globaler MS-Analysen eher nicht erfasst werden können.

Ein weiterer Aspekt, der betrachtet wurde, war der Phosphorylierungsstatus von Phospholamban aufgrund der Funktionsweise dieses Proteins. Als Regulator bzw. Inhibitor der kardialen Calcium-ATPase 2 des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA2), welche den Calcium-Transport aus dem Zytosol in das sarkoplasmatische Retikulum ermöglicht, kann PLN phosphoryliert und unphosphoryliert vorliegen. Dabei übt PLN seine inhibierende Funktion nur in unphosphorylierter Form aus und hemmt SERCA2 durch direkte Interaktion. Liegt PLN allerdings in phosphorylierter Form vor, verliert es seine inhibierende Funktion. Nachfolgende Abbildung 4.27 zeigt die WB-Signale von phosphoryliertem Phospholamban (p-PLN) im Vergleich zu Gesamt-Phospholamban (PLN) und die normalisierten Intensitäten als Verhältnis zueinander (p-PLN/PLN Ratio).



**Abb. 4.27: Analyse des Phosphorylierungsstatus von Phospholamban mittels Western Blot. (A)** Western Blot Signale von Gesamt-Phospholamban (links) und phosphoryliertem (Ser16) Phospholamban (rechts). (LK: Ladekontrolle aus gepoolter Probe von Sham<sub>LM</sub>) **(B)** Auf Gesamtprotein normalisierte Intensitäten von PLN aus dem Western Blot. Dargestellte Signale und Intensitäten von PLN (A, B) sind abgebildet, wie bereits in Abb. 4.26. **(C)** Ratio der normalisierten Intensitäten von p-PLN vs. PLN aus dem Western Blot. Balken stellen Mittelwerte + SD dar. (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001; n = 6, außer Sham<sub>LM</sub>: n = 5; PLN: Phospholamban; p-PLN: phosphoryliertes Phospholamban)

Nach TAC war sowohl in behandelten als auch unbehandelten Tieren ein deutlich erhöhter Phosphorylierungsgrad von PLN anhand der Signalstärke aus dem WB zu erkennen (Abb. 4.27A). Zusätzlich zu den verringerten Mengen an PLN in TAC<sub>LM</sub> (Abb. 4.27B) zeigte sich ein signifikant erhöhtes Ratio von p-PLN/PLN in TAC<sub>LM</sub> im Vergleich zur entsprechenden Sham-Kontrollgruppe (Abb. 4.27C). Trotz der relativ starken interindividuellen Schwankungen im Phosphorylierungsgrad innerhalb der verschiedenen Behandlungsgruppen schien eine RIO-Behandlung diese Zunahme in TAC<sub>RIO</sub> abzumildern, wenn auch nicht statistisch signifikant.



## 4.4 Vergleichende Analyse der RNA-Seq und Proteomdaten

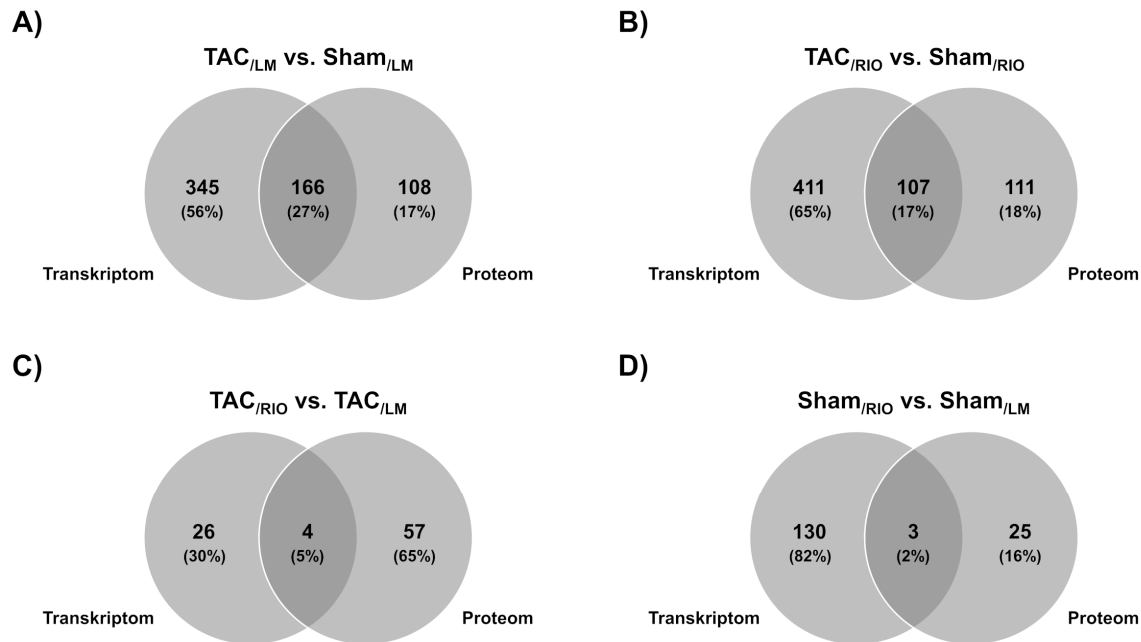
### 4.4.1 Generelle quantitative Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen Transkriptom- und Proteommustern herzinsuffizienter Mäuse mit und ohne Riociguatmedikation

Vergleicht man die Ergebnisse der Transkriptom- und Proteomanalysen miteinander, zeigt sich, dass für die 1415 identifizierten und quantifizierten Proteinen auch fast alle (96%) Transkripte quantifiziert wurden. Die Proteine spiegeln jedoch nur einen Bruchteil (7,3%) im Vergleich zu den insgesamt 18581 detektierten Transkripten wider (Tab. 4.4).

**Tabelle 4.4: Quantitative Gegenüberstellung der Transkriptom- und Proteomdaten.** Die Tabelle fasst die identifizierten und quantifizierten Transkripte und Proteine aus RNA-Seq und MS-Analysen zusammen und gibt deren Überschneidung an.

Globale Analyse	Gesamtzahl identifizierter und quantifizierter Transkripte/Proteine	Überschneidung zwischen Transkriptom und Proteom
Transkriptom	18581	1359 (7,3 %)
Proteom	1415	1359 (96 %)

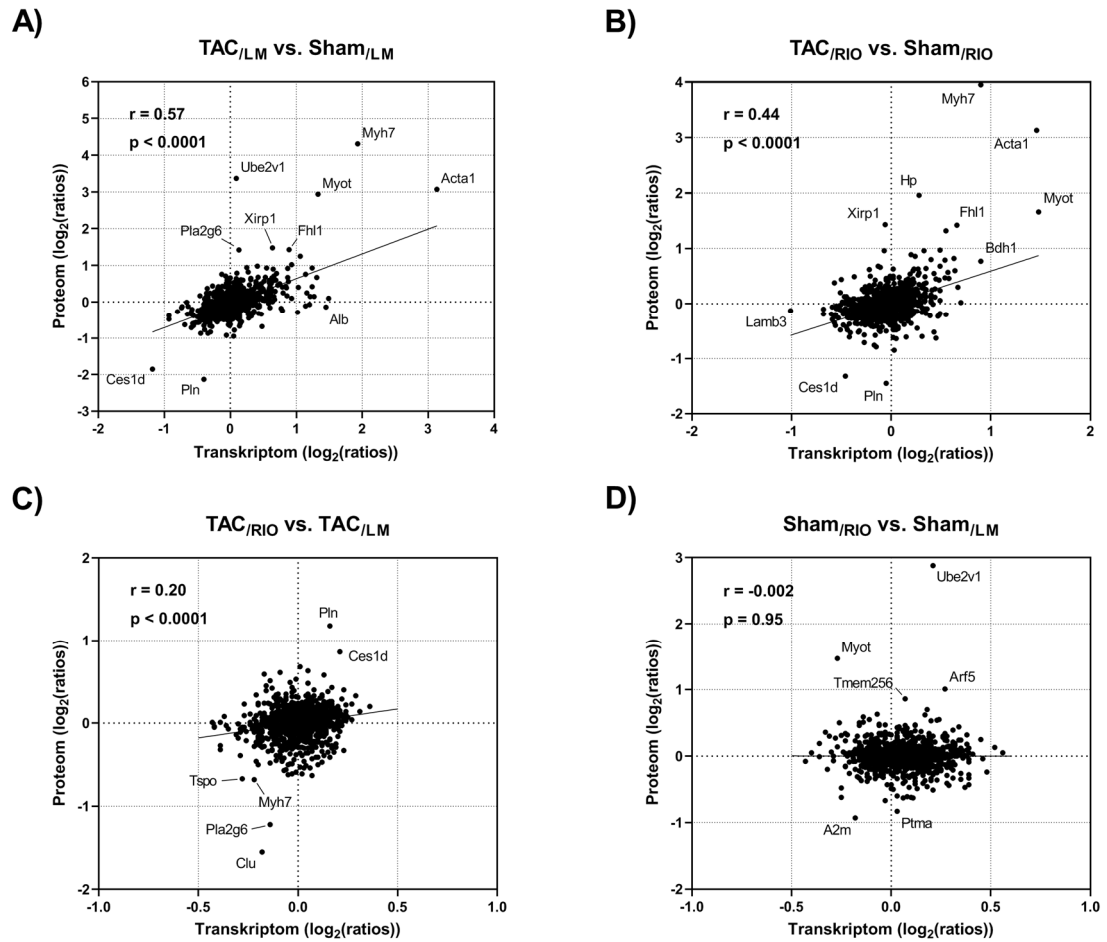
Eine weitere Betrachtung erfolgte anhand der in beiden Datensätzen quantifizierten 1359 Genprodukte (Transkripte bzw. Proteine), um Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu eruieren. Unter Berücksichtigung signifikanter Änderungen auf Genexpressions- bzw. Proteinebene ergaben sich nur geringe Schnittmengen, wobei insgesamt deutlich mehr signifikant veränderte Transkripte ( $q < 0,05$ ) als Proteine ( $p < 0,05$ ) beobachtet wurden (Abb. 4.28). Nur der direkte Vergleich des Einflusses von RIO auf TAC-Tiere ( $TAC_{RIO}$  vs.  $TAC_{LM}$ ) zeigte weniger veränderte Transkripte als Proteine (Abb. 4.28C). Ca. 20-30% der Veränderungen aufgrund von TAC in unbehandelten ( $TAC_{LM}$  vs.  $Sham_{LM}$ ) und behandelten ( $TAC_{RIO}$  vs.  $Sham_{RIO}$ ) Tieren wurden jeweils in beiden Datensätzen identifiziert (Abb. 4.28A, B). Noch geringer waren die Schnittmengen der direkten Vergleiche des Einflusses von RIO auf TAC- bzw. Sham-Tiere mit 5% und 2% (Abb. 4.28C, D).



**Abb. 4.28: Schnittmengen signifikanter Veränderungen im Transkriptom und Proteom.** Dargestellt sind die Anzahl signifikant veränderter Transkripte ( $q < 0,05$ ) bzw. Proteine ( $p < 0,05$ ), die in beiden Datensätzen (RNA-Seq, MS/MS) identifiziert wurden und deren Schnittmenge. **(A)** Auswirkungen von TAC in Lösungsmittel behandelten Tieren (TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>). **(B)** Auswirkungen von TAC in Riociguat behandelten Tieren (TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub>). **(C)** Einfluss von Riociguat in TAC-Tieren (TAC<sub>/RIO</sub> vs. TAC<sub>/LM</sub>). **(D)** Einfluss von Riociguat in Sham-Tieren (Sham<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>).

Die Ergebnisse zur Korrelation (Pearson) der Ratios aus RNA-Seq und MS/MS-Analysen unterstrichen teilweise die zuvor gezeigten Daten (Abb. 4.29). So waren die stärksten Korrelationen für TAC-induzierte Veränderungen in TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub> ( $r = 0,57$ ; Abb. 4.29A) und TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub> ( $r = 0,44$ ; Abb. 4.29B) zu verzeichnen. Allerdings ergab sich auch für den Vergleich TAC<sub>/RIO</sub> vs. TAC<sub>/LM</sub> eine signifikante, wenn auch nur moderate, Korrelation ( $r = 0,20$ ; Abb. 4.29C). Da es nur eine geringe Schnittmenge von signifikanten Änderungen gab, ist der Befund auf nichtsignifikante Änderungen bei gleicher Regulationsrichtung auf Transkript- und Proteinebene zurückzuführen. Aufgrund der insgesamt sehr niedrigen Effekte (FC um 1) lag für den Vergleich Sham<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub> keine signifikante Korrelation vor (Abb. 4.29D) und wurde daher in den nachfolgenden Betrachtungen nicht weiter berücksichtigt.

Eine vollständige Gegenüberstellung von Proteom- und Transkriptomdaten ist dem **Anhang S5** zu entnehmen.



**Abb. 4.29: Vergleich von Transkriptom- und Proteom-Resultaten der verschiedenen Gruppenvergleiche.** Dargestellt sind die  $\log_2$ -transformierten Ratios aus den Transkriptom- (x-Achse) bzw. Proteomanalysen (y-Achse) aus den verschiedenen Gruppenvergleichen TAC<sub>LM</sub> vs. Sham<sub>LM</sub> (A), TAC<sub>RIO</sub> vs. Sham<sub>RIO</sub> (B), TAC<sub>RIO</sub> vs. TAC<sub>LM</sub> (C) und Sham<sub>RIO</sub> vs. Sham<sub>LM</sub> (D). (Pearson-Korrelation)

#### 4.4.2 Molekulare Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen Transkriptom und Proteom herzinsuffizienter Mäuse mit und ohne Riociguatmedikation auf funktioneller Ebene

Ein Vergleich zwischen den Regulationsrichtungen der Genprodukte aus Genexpressions- und Proteomanalysen zeigte, dass erwartungsgemäß nicht alle Werte übereinstimmten (Tab. 4.5). So ergaben sich ca. 30-40% inverse Befunde unter Betrachtung aller zuvor für die Korrelationsanalyse berücksichtigter Genprodukte der verbleibenden drei Vergleiche (Tab. 4.5, oberer Teil). Untergliedert in die verschiedenen zellulären Lokalisationen zeigte sich dabei keine evidente Verschiebung der Verhältnisse von identischen und inversen Regulationen in Richtung eines bestimmten Zellkompartimentes.

**Tabelle 4.5: Gegenüberstellung der Anzahl identischer und inverser Regulationen zwischen Transkriptom und Proteom.** Die Tabelle gibt einen Überblick über die Verhältnisse von gleichen (ident) bzw. unterschiedlichen (invers) Regulationsrichtungen der identifizierten Genprodukte (Transkripte und Proteine) innerhalb der angegebenen Signifikanzgrenzen und Vergleiche. Neben der Gesamtanzahl ist ebenfalls die Anzahl im Detail für die jeweilige zelluläre Lokalisation des Genproduktes dargestellt.

*alle Genprodukte aus der Korrelationsanalyse*

Lokalisation	TAC <sub>/LM</sub> vs. Sham <sub>/LM</sub>		TAC <sub>/RIO</sub> vs. Sham <sub>/RIO</sub>		TAC <sub>/RIO</sub> vs. TAC <sub>/LM</sub>	
	ident	invers	ident	invers	ident	invers
Zytoplasma	281 (66%)	142 (34%)	250 (57%)	186 (43%)	251 (57%)	189 (43%)
Mitochondrien	224 (76%)	71 (24%)	213 (71%)	88 (29%)	194 (64%)	108 (36%)
Nukleus	51(64%)	29 (36%)	47 (59%)	33 (41%)	43 (49%)	44 (51%)
Plasmamembran	47 (59%)	32 (41%)	56 (66%)	29 (34%)	48 (58%)	35 (42%)
Extrazellularraum	37 (65%)	20 (35%)	30 (50%)	30 (50%)	32 (51%)	31 (49%)
Sonstige	6 (100%)	-	4 (80%)	1 (20%)	3 (50%)	3 (50%)
<b>insgesamt</b>	<b>646 (69%)</b>	<b>294 (31%)</b>	<b>600 (62%)</b>	<b>367 (38%)</b>	<b>571 (58%)</b>	<b>410 (42%)</b>

*alle Genprodukte die entweder im Transkriptom oder Proteom signifikant verändert waren*

Lokalisation	TAC <sub>/LM</sub> vs. Sham <sub>/LM</sub>		TAC <sub>/RIO</sub> vs. Sham <sub>/RIO</sub>		TAC <sub>/RIO</sub> vs. TAC <sub>/LM</sub>	
	ident	invers	ident	invers	ident	invers
Zytoplasma	165 (81%)	38 (19%)	143 (67%)	69 (33%)	20 (63%)	12 (37%)
Mitochondrien	143 (85%)	25 (15%)	150 (82%)	32 (18%)	28 (85%)	5 (15%)
Nukleus	26 (72%)	10 (28%)	26 (63%)	15 (37%)	3 (38%)	5 (62%)
Plasmamembran	29 (67%)	14 (33%)	28 (74%)	10 (26%)	4 (80%)	1 (20%)
Extrazellularraum	23 (72%)	9 (28%)	11 (52%)	10 (48%)	3 (75%)	1 (25%)
Sonstige	3 (100%)	-	4 (100%)	-	1 (50%)	1 (50%)
<b>insgesamt</b>	<b>389 (80%)</b>	<b>96 (20%)</b>	<b>362 (73%)</b>	<b>136 (27%)</b>	<b>59 (70%)</b>	<b>25 (30%)</b>



*nur signifikante Genprodukte aus den Schnittmengen der Vergleiche*

Lokalisation	TAC <sub>/LM</sub> vs. Sham <sub>/LM</sub>		TAC <sub>/RIO</sub> vs. Sham <sub>/RIO</sub>		TAC <sub>/RIO</sub> vs. TAC <sub>/LM</sub>	
	ident	invers	ident	invers	ident	invers
Zytoplasma	58 (95%)	3 (5%)	34 (94%)	2 (6%)	1 (100%)	-
Mitochondrien	79 (100%)	-	58 (97%)	2 (3%)	3 (100%)	-
Nukleus	2 (67%)	1 (33%)	1 (100%)	-	-	-
Plasmamembran	12 (92%)	1 (8%)	5 (83%)	1 (17%)	-	-
Extrazellularraum	7 (88%)	1 (12%)	1 (50%)	1 (50%)	-	-
Sonstige	2 (100%)	-	2 (100%)	-	-	-
<b>insgesamt</b>	<b>160 (96%)</b>	<b>6 (4%)</b>	<b>101 (94%)</b>	<b>6 (6%)</b>	<b>4 (100%)</b>	<b>-</b>

Die Verhältnisse von identischen bzw. inversen Regulationsrichtungen verschoben sich jedoch unter Berücksichtigung verschiedener Signifikanzgrenzen. Bei der Betrachtung von ausschließlich signifikanten Werten aus Transkriptom- bzw. Proteomanalysen sank die Anzahl inverser Regulationen insgesamt auf ca. 20-30% (Tab. 4.5, mittlerer Teil). Der Vergleich der signifikanten Schnittmenge, wie bereits in Abbildung 4.28 dargestellt, ergab hingegen sogar eine fast vollständige Übereinstimmung der Regulationsrichtungen von Genexpression und Proteom (Tab. 4.5, unterer Teil).

Im Weiteren erfolgte eine vergleichende Betrachtung zwischen RNA-Seq und Proteomergebnissen in Bezug auf CVD relevante Signalwege. Dabei lag der Fokus auf den Daten der Proteomanalysen als limitierender Faktor aufgrund der Tatsache, dass sich das Proteom fast vollständig in den Genexpressionsdaten widerspiegelt, andersherum die Genexpressionsdaten allerdings nicht in den Proteomdaten. Tabelle 4.6 listet alle zugeordneten Proteine einiger CVD relevanter Signalwege (*Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation, Oxidative Phosphorylation, Mitochondrial Dysfunction, Actin Cytoskeleton Signaling, Fibrosis*) zusammen mit ihren Abundanzunterschieden ( $\log_2$ Ratios) innerhalb der verschiedenen Gruppenvergleiche auf. Dem gegenübergestellt wurden die entsprechenden Genexpressionsveränderungen ( $\log_2$ Ratios). Erstaunlicherweise zeigte sich fast durchgängig die gleiche Ausrichtung ( $\uparrow$  oder  $\downarrow$ ) zwischen Genexpression und veränderter Proteinmenge innerhalb des entsprechenden Vergleiches, wenn auch nicht immer signifikant. Bei den wenigen Genen bzw. Proteinen mit entgegengesetzter Expression zwischen beiden Analysemethoden handelte es sich bei jedem um nicht signifikante und meist sehr gering veränderte Werte (z.B. Actr3, Myh9, Rdx). Ebenfalls war zu beobachten, dass die Ausprägung der Genexpressionsstärke insgesamt oft schwächer war im Vergleich zur Änderung auf Proteinebene. Jedoch zeigte sich bei beiden Analysemethoden ein ähnliches Bild, die Attenuierung (TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub>) bzw. Revertierung (TAC<sub>/RIO</sub> vs. TAC<sub>/LM</sub>) der TAC-induzierten Veränderungen durch eine RIO-Medikation.

**Tabelle 4.6: Quantitative Gegenüberstellung der Transkriptom- und Proteomdaten für einige CVD relevante Signalwege.** Die Tabelle fasst die identifizierten und quantifizierten Transkripte und Proteine für einige relevante Signalwege zusammen und stellt die Expressionsänderungen bzw. Abundanzunterschiede (log2Ratio) aus RNA-Seq und MS-Analysen vergleichend gegenüber. Dargestellt sind die Gruppenvergleiche, die eine signifikante Korrelation zwischen MS/MS und RNA-Seq Analysen aufwiesen. Signifikante Veränderungen sind fettgedruckt hervorgehoben (Proteom:  $p < 0,05$ ; Transkriptom:  $q < 0,05$ ).

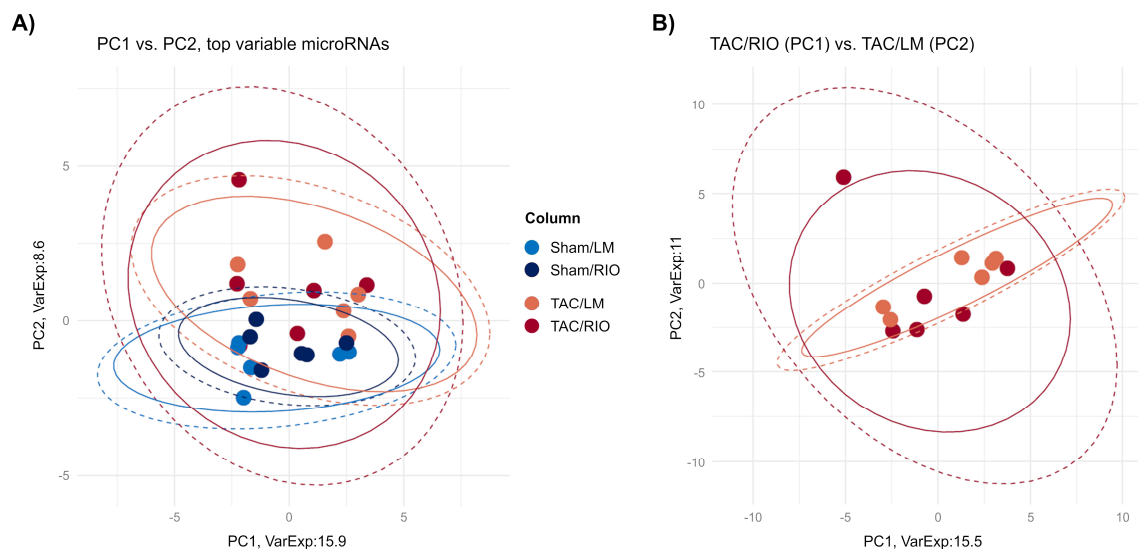
	Gen ID	Beschreibung	TAC <sub>/LM</sub> vs. Sham <sub>/LM</sub>		TAC <sub>/RIO</sub> vs. Sham <sub>/RIO</sub>		TAC <sub>/RIO</sub> vs. TAC <sub>/LM</sub>	
			MS/MS (log2Ratio)	RNA-Seq (log2Ratio)	MS/MS (log2Ratio)	RNA-Seq (log2Ratio)	MS/MS (log2Ratio)	RNA-Seq (log2Ratio)
Fatty Acid Oxidation ( $\beta$ -Oxidation)	Hsd17b8	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 8	<b>-0,39</b>	<b>-0,34</b>	<b>-0,26</b>	<b>-0,31</b>	0,12	0,13
	Hadh	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	<b>-0,39</b>	<b>-0,45</b>	<b>-0,19</b>	<b>-0,42</b>	0,11	0,14
	Hadha	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	<b>-0,39</b>	<b>-0,29</b>	<b>-0,26</b>	<b>-0,22</b>	0,09	0,07
	Acadm	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	<b>-0,39</b>	<b>-0,35</b>	<b>-0,23</b>	<b>-0,17</b>	0,09	0,13
	Echs1	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	<b>-0,39</b>	<b>-0,32</b>	<b>-0,10</b>	<b>-0,26</b>	<b>0,22</b>	0,14
	Hadhb	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	<b>-0,39</b>	<b>-0,41</b>	<b>-0,25</b>	-0,11	0,13	0,19
	Eci2	Enoyl-CoA delta isomerase 2, mitochondrial	<b>-0,39</b>	<b>-0,36</b>	-0,16	-0,17	0,14	0,12
	Hsd17b4	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	<b>-0,39</b>	-0,15	0,02	-0,09	0,16	0,07
	Acaa1a	3-ketoacyl-CoA thiolase A, peroxisomal	<b>-0,47</b>	-0,05	-0,18	<b>-0,35</b>	0,04	-0,08
	lvd	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	<b>-0,48</b>	-0,16	<b>-0,20</b>	<b>-0,28</b>	0,11	0,03
	Eci1	Enoyl-CoA delta isomerase 1, mitochondrial	<b>-0,49</b>	<b>-0,44</b>	<b>-0,23</b>	<b>-0,34</b>	0,20	0,16
	Acaa2	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	<b>-0,71</b>	<b>-0,59</b>	<b>-0,40</b>	<b>-0,56</b>	<b>0,22</b>	0,12
Oxidative Phosphorylation	Ndufa1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 1	<b>-0,37</b>	<b>-0,18</b>	<b>-0,24</b>	-0,09	0,18	0,12
	Ndufab1	Acyl carrier protein, mitochondrial	<b>-0,38</b>	<b>-0,29</b>	<b>-0,25</b>	-0,07	0,01	0,22
	Uqcrb	Cytochrome b-c1 complex subunit 7	<b>-0,38</b>	<b>-0,28</b>	<b>-0,22</b>	0,00	0,10	0,18
	Ndufv3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, mitochondrial	<b>-0,41</b>	-0,04	<b>-0,42</b>	<b>-0,18</b>	0,09	0,03
	Ndufa12	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12	<b>-0,42</b>	-0,17	<b>-0,22</b>	<b>-0,20</b>	0,19	0,09
	Ndufs6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial	<b>-0,44</b>	-0,15	<b>-0,39</b>	<b>-0,26</b>	-0,14	0,06
	Ndufa7	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 7	<b>-0,62</b>	0,00	<b>-0,26</b>	<b>-0,43</b>	0,22	-0,10
Mitochondrial Dysfunction	Ndufa1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 1	<b>-0,37</b>	<b>-0,18</b>	<b>-0,24</b>	-0,09	0,18	0,12
	Ndufab1	Acyl carrier protein, mitochondrial	<b>-0,38</b>	<b>-0,29</b>	<b>-0,25</b>	-0,07	0,01	0,22
	Uqcrb	Cytochrome b-c1 complex subunit 7	<b>-0,38</b>	<b>-0,28</b>	<b>-0,22</b>	0,00	0,10	0,18
	Ndufv3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, mitochondrial	<b>-0,41</b>	-0,04	<b>-0,42</b>	<b>-0,18</b>	0,09	0,03
	Ndufa12	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12	<b>-0,42</b>	-0,17	<b>-0,22</b>	<b>-0,20</b>	0,19	0,09
	Ndufs6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial	<b>-0,44</b>	-0,15	<b>-0,39</b>	<b>-0,26</b>	-0,14	0,06
	Ndufa7	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 7	<b>-0,62</b>	0,00	<b>-0,26</b>	<b>-0,43</b>	0,22	-0,10
	Fis1	Mitochondrial fission 1 protein	<b>-0,63</b>	-0,03	<b>-0,39</b>	<b>-0,19</b>	-0,17	0,01

Actin Cytoskeleton Signaling	Myh7	Myosin-7	4,31	1,93	3,95	0,90	-0,68	-0,22
	Acta1	Actin, alpha skeletal muscle	3,07	3,13	3,13	1,46	0,35	-0,10
	My11	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	0,76	1,14	0,82	0,63	0,26	-0,07
	Flna	Filamin-A	0,68	0,42	0,96	-0,07	0,11	-0,24
	Actr3	Actin-related protein 3	0,44	-0,03	-0,20	-0,05	-0,21	0,03
	Myh9	Myosin-9	0,43	0,84	0,30	-0,21	0,01	-0,39
	Rdx	Radixin	-0,42	-0,15	-0,28	0,08	0,23	0,05
Fibrosis	Myh7	Myosin-7	4,31	1,93	3,95	0,90	-0,68	-0,22
	Xirp1	Xin actin-binding repeat-containing protein 1	1,48	0,64	1,43	-0,06	-0,09	-0,20
	My11	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	0,76	1,14	0,82	0,63	0,26	-0,07
	Hspb8	Heat shock protein beta-8	0,71	0,66	0,80	0,40	0,21	-0,02
	Csrp3	Cysteine and glycine-rich protein 3	0,57	0,51	0,63	0,23	0,11	-0,06
	Col1a2	Collagen alpha-2(I) chain	0,56	0,88	-0,22	0,39	-0,46	-0,21
	Gnas	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short	0,53	-0,02	0,08	-0,06	-0,17	0,04
	Myh9	Myosin-9	0,43	0,84	0,30	-0,21	0,01	-0,39
	Dsp	Desmoplakin	0,40	0,03	0,18	-0,08	0,00	0,01
	Acadm	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	-0,39	-0,35	-0,23	-0,17	0,09	0,13
	Ndufs6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial	-0,44	-0,15	-0,39	-0,26	-0,14	0,06
	Coq9	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial	-0,49	-0,10	-0,22	-0,19	0,03	0,06
	Pln	Cardiac phospholamban	-2,13	-0,40	-1,45	-0,05	1,18	0,16

## 4.5 Einfluss der Riociguat-Behandlung auf das murine linksventrikuläre microRNA-Expressionsprofil nach TAC

### 4.5.1 Relative Quantifizierung der Unterschiede im Expressionsmuster herzinsuffizienter Mäuse mit und ohne Riociguatmedikation

Wie bereits erwähnt, wurden angereicherte kleine RNAs aus den RNA-Extrakten aller 24 explantierter linken Ventrikel der 4 verschiedenen Behandlungsgruppen (Sham/LM, Sham/RIO, TAC/LM, TAC/RIO) mittels HiSeq® 4000 System sequenziert. Die erhaltenen miRNA-Seq Rohdaten (*raw counts*) wurden anschließend unter Verwendung der Bioconductor Software DESeq2 in R weiterverarbeitet und die normalisierten *Counts* der identifizierten microRNAs berechnet. Insgesamt wurden 585 bekannte microRNAs identifiziert und quantifiziert. Als erstes wurde wieder eine PCA durchgeführt, um einen Eindruck über die Variation innerhalb der Gruppen und die Unterschiede zwischen den vier Gruppen zu gewinnen (Abb. 4.30), wobei jeder Punkt in der Abbildung ein Tier darstellt und die verschiedenen Farben die jeweilige Gruppenzugehörigkeit anzeigen. Eine geringe Gesamtvariation wird durch unmittelbare Punktnähe verdeutlicht. Je weiter die Punkte voneinander entfernt sind, desto größer ist die Variation bzw. der Unterschied innerhalb oder zwischen den Gruppen.



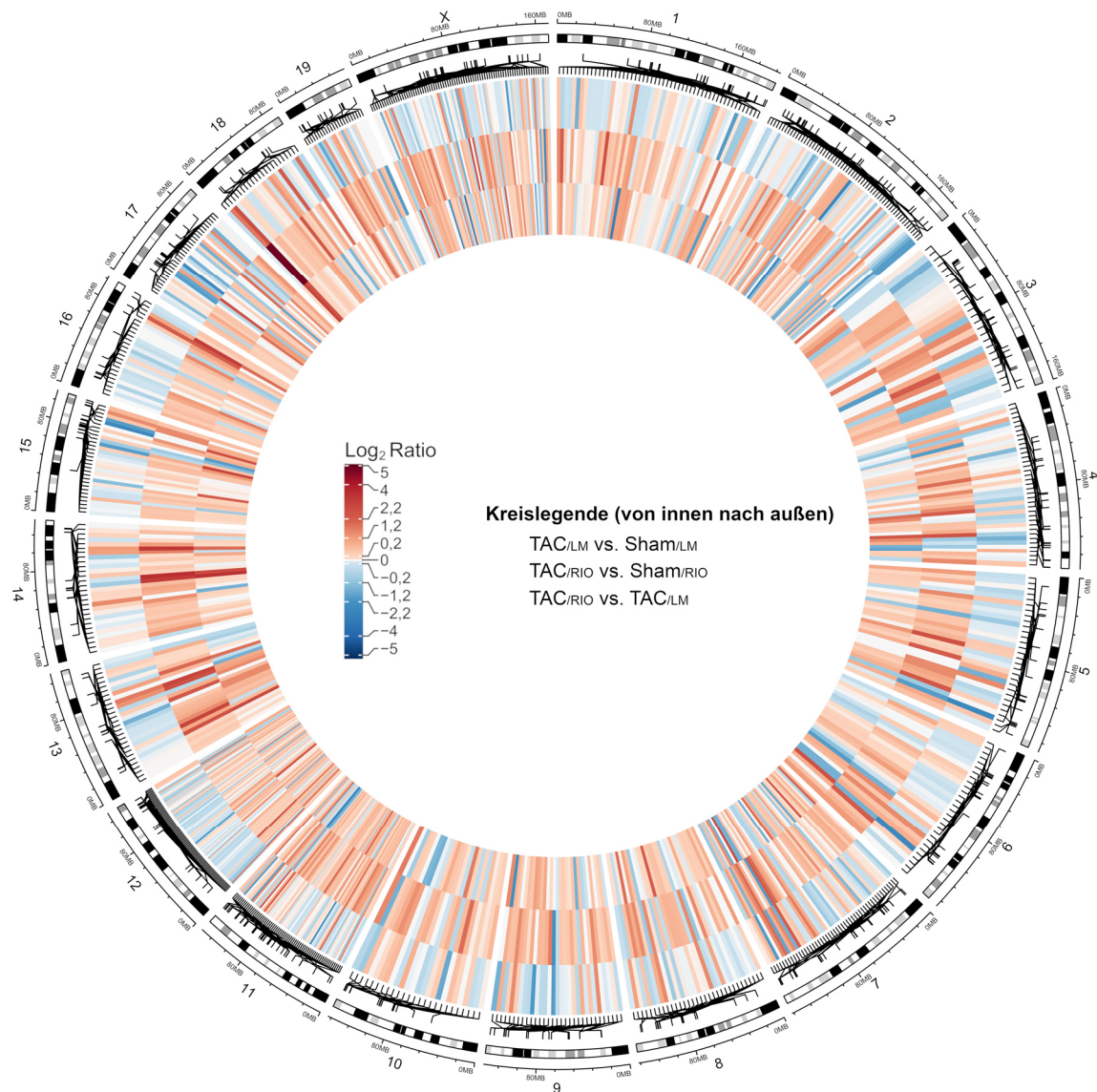
**Abb. 4.30: Hauptkomponentenanalyse (PCA-Plot) auf Basis der TOP variablen microRNAs der verschiedenen Behandlungsgruppen.** Es zeigte sich ein relativ deutlicher Unterschied zwischen TAC und Sham operierten Tieren (A), jedoch keine distinkte Gruppierung der Behandlungsgruppen innerhalb der TAC-Tiere (B). (n=6)

Diese Hauptkomponentenanalyse zeigte einen Unterschied zwischen dem kardialen microRNA-Profil gesunder Sham- und erkrankter TAC-Tiere (Abb. 4.30A). Allerdings zeigten beide Gruppierungen eine leichte Überschneidung. Die Auswirkungen der OP waren scheinbar nicht so stark ausgeprägt, wie bei den zuvor beschriebenen Genexpressions- und Proteomanalysen. Eine distinkte Gruppierung zwischen Riociguat behandelten und unbehandelten TAC-Tieren konnte nicht beobachtet werden (Abb. 4.30B). Des Weiteren konnte kein Unterschied zwischen Sham<sub>/LM</sub> und Sham<sub>/RIO</sub> mittels PCA festgestellt werden.

Abbildung 4.31 zeigt als Gesamtüberblick die Expressionsveränderungen aller identifizierten und bekannten microRNAs, zusammen mit deren chromosomaler Lokalisation im murinen Genom. Analog zu den bisherigen *Heatmaps* sind ebenfalls die Veränderungen durch TAC in unbehandelten und behandelten Tieren im Vergleich zur jeweiligen Sham-Kontrollgruppe und als direkter Vergleich die Effekte einer Behandlung zwischen den beiden Gruppen der erkrankten TAC-Tiere mit und ohne RIO-Medikation dargestellt.

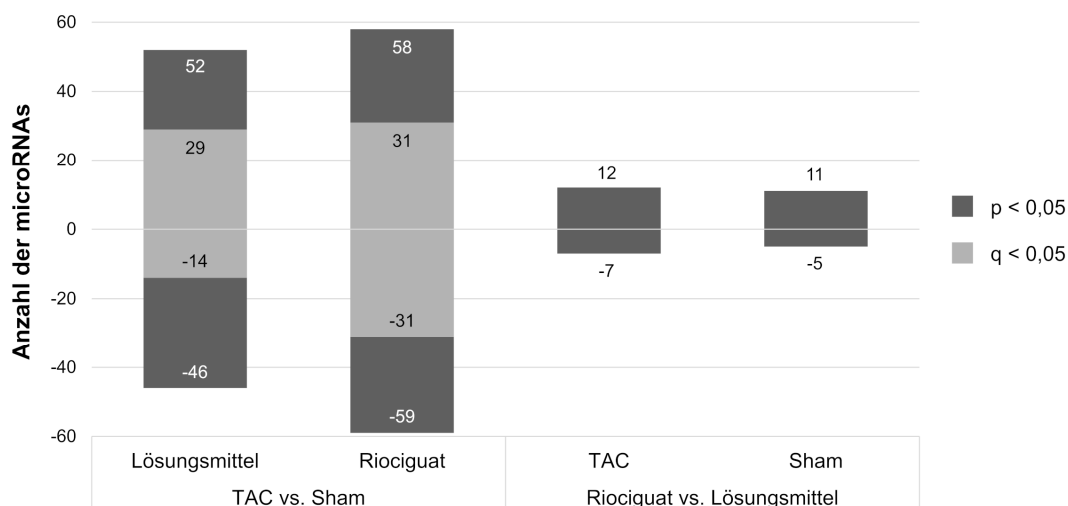
Eine erste visuelle Inspektion der Daten wies auf eine höhere microRNA-Expression in sowohl unbehandelten als auch behandelten TAC-Tieren hin (Abb. 4.31, innerer und mittlerer Kreis). Beide Expressionsprofile wirkten allerdings sehr heterogen und unterschieden sich deutlich voneinander. Der direkte Vergleich von TAC<sub>/RIO</sub> vs. TAC<sub>/LM</sub> (Abb. 4.31, äußerer Kreis) weist darauf hin, dass auch auf microRNA-Ebene eine Revertierung oder zumindest Abschwächung der durch TAC verursachten Expressionsänderungen durch eine RIO-Medikation stattfand (vermehrter Farbwechsel von Rot zu Blau).

Die Genloci der identifizierten microRNAs zeigten sich über alle Chromosomen des murinen Genoms verteilt, nur nicht auf dem Y-Chromosom. Des Weiteren zeigte sich eine Häufung veränderter microRNAs mit kodierenden Sequenzen auf den Chromosomen 1, 2, 7, 11, 12 und X (Loci-Dichte in Relation zur Balkenbreite der entsprechenden Chromosomen, Abb. 4.31, äußerster Ring).



**Abb. 4.31: Zirkuläre Heatmap der veränderten microRNAs und deren chromosomale Lokalisation.** Dargestellt sind die Veränderungen aller identifizierten microRNAs der verschiedenen Gruppenvergleiche in ihrer Gesamtheit. Die Reihenfolge der Vergleiche folgt von innen nach außen TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>, TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub> und TAC<sub>/RIO</sub> vs. TAC<sub>/LM</sub>. Expressionsveränderungen sind als log<sub>2</sub>-Ratios angegeben. Rotfärbung kennzeichnet eine erhöhte, Blaufärbung eine verringerte Expression. Der äußerste Ring bildet die murinen Chromosomen ab, zusammen mit der Lokalisation der entsprechenden microRNAs im Genom.

Für eine detaillierte Betrachtung der relativ quantifizierten microRNAs wurden im Weiteren wieder alle bisherigen Gruppenvergleiche herangezogen, um die Änderungen in den LV microRNA-Expressionsprofilen nach TAC und unter RIO-Behandlung zu identifizieren (TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>, TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub>, TAC<sub>/RIO</sub> vs. TAC<sub>/LM</sub>, Sham<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>). Abbildung 4.32 zeigt die Anzahl aller signifikant veränderten microRNAs der verschiedenen Vergleichsgruppen.

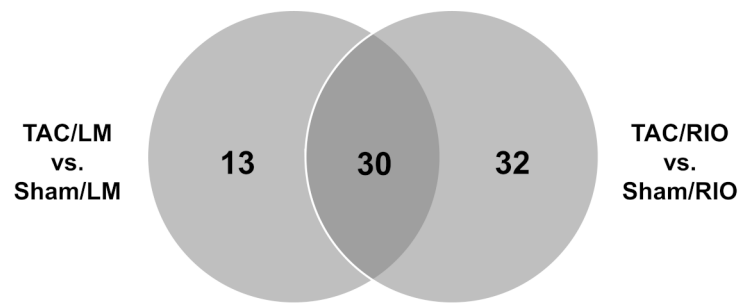


**Abb. 4.32: Anzahl aller signifikant veränderten microRNAs der verschiedenen Vergleichsgruppen.** Dargestellt ist die Anzahl in ihrer Expression veränderter microRNAs innerhalb der angegebenen Signifikanzgrenzen und Vergleichsgruppen. Negative Vorzeichen kennzeichnen die Anzahl herunterregulierter microRNAs. Balken zeigen von links nach rechts folgende Vergleiche: Auswirkungen von TAC in Lösungsmittel behandelten Tieren ( $TAC_{/LM}$  vs.  $Sham_{/LM}$ ), Auswirkungen von TAC in Riociguat behandelten Tieren ( $TAC_{/RIO}$  vs.  $Sham_{/RIO}$ ), Einfluss von Riociguat in TAC-Tieren ( $TAC_{/RIO}$  vs.  $TAC_{/LM}$ ), Einfluss von Riociguat in Sham-Tieren ( $Sham_{/RIO}$  vs.  $Sham_{/LM}$ ). (Dunkelgrau: regulierte microRNAs mit  $p < 0,05$ ; Hellgrau: regulierte microRNAs mit  $q < 0,05$ )

Die meisten Veränderungen wurden nach TAC im Vergleich zu Sham in RIO behandelten Tieren identifiziert ( $p < 0,05$ : 117 microRNAs;  $q < 0,05$ : 62 microRNAs). In unbehandelten Tieren waren es etwas weniger ( $p < 0,05$ : 98 microRNAs;  $q < 0,05$ : 43 microRNAs). Von den signifikant veränderten microRNAs ( $q < 0,05$ ) zeigten in  $TAC_{/LM}$  vs.  $Sham_{/LM}$  ( $n = 29\uparrow$ ) und  $TAC_{/RIO}$  vs.  $Sham_{/RIO}$  ( $n = 31\uparrow$ ) etwa gleich viele eine höhere Expression. Deutlich mehr microRNAs zeigten dagegen eine niedrigere Expression nach RIO-Behandlung in  $TAC_{/RIO}$  vs.  $Sham_{/RIO}$  ( $n = 31\downarrow$ ) im Vergleich zu  $TAC_{/LM}$  vs.  $Sham_{/LM}$  ( $n = 14\downarrow$ ). Die direkten Vergleiche zum Einfluss der Medikation auf TAC- bzw. Sham-Tiere ergaben nur wenige Veränderungen ( $p < 0,05$ ) bzw. keine nach multipler Testkorrektur (Abb. 4.32).

Eine ausführliche Auflistung aller identifizierten microRNAs, deren Veränderungen und *Counts* auf Einzelprobenebene ist dem **Anhang S6** zu entnehmen.

Ein näherer Vergleich der signifikant veränderten microRNAs nach multipler Testkorrektur ( $q < 0,05$ ) durch TAC in unbehandelten und behandelten Tieren zeigte eine deutliche Schnittmenge von 30 (Abb. 4.33). 13 hingegen zeigten nur Änderungen in unbehandelten Tieren nach TAC ( $TAC_{/LM}$  vs.  $Sham_{/LM}$ ). Ein größerer Teil der signifikant veränderten microRNAs wurde jedoch ausschließlich in TAC-Tieren mit Medikation identifiziert ( $n = 32$ ).



**Abb. 4.33: Überschneidung der signifikant veränderten microRNAs aufgrund von TAC in Lösungsmittel und Riociguat behandelten Tieren.** Dargestellt ist die Anzahl der microRNAs, die eine signifikante Expressionsänderung ( $q < 0,05$ ) aufgrund der Aortenkonstriktion in Lösungsmittel ( $TAC_{LM}$  vs.  $Sham_{LM}$ ) und Riociguat ( $TAC_{RIO}$  vs.  $Sham_{RIO}$ ) behandelten Tieren aufwiesen und deren Schnittmenge.

Betrachtet man diese signifikant veränderten microRNAs nun im Detail, zeigten sich die stärksten Veränderungen in der eben beschriebenen Schnittmenge (Tab. 4.7, mittlerer Teil). Mit einer mehr als 9fachen Erhöhung wies z.B. „miR-208b-3p“ die stärkste Zunahme aufgrund von TAC, ohne Medikation, auf. Bei Medikation ( $TAC_{RIO}$  vs.  $Sham_{RIO}$ ) war die Expression dieser microRNA geringer ( $FC = 6,49$ ), jedoch immer noch stark erhöht. Die stärkste Expressionsveränderung in RIO behandelten TAC-Tieren im Vergleich zu deren Sham-Kontrollgruppe zeigte hingegen „miR-122-5p“ mit einem  $FC = 13,36$ , bei einer weniger starken Erhöhung in  $TAC_{LM}$  vs.  $Sham_{LM}$  ( $FC = 5,18$ ).

Insgesamt war ein reverser Effekt der RIO-Medikation auf TAC-induzierte microRNA-Expressionsveränderungen zu beobachten, der anhand der ausschließlich in  $TAC_{LM}$  vs.  $Sham_{LM}$  signifikant veränderten microRNAs am deutlichsten war (Tab. 4.7, oberer Teil). Die entsprechenden 13 microRNAs wurden zwar ebenfalls in  $TAC_{RIO}$  vs.  $Sham_{RIO}$  quantifiziert, zeigten aber keine signifikanten Unterschiede. Auch wenn nicht signifikant, so zeigten diese microRNAs in Gegenüberstellung alle abgeschwächte Expressionen nach RIO-Behandlung. Weitere revertierte microRNAs zeigten sich ebenfalls in der Schnittmenge beider Gruppenvergleiche (Tab. 4.7, mittlerer Teil). Besonders hervorzuheben sind hierbei „miR-27b-3p“, „miR-199a-5p“, „miR-214“, „miR-1983“, „miR-7688-5p“ und „miR-9769-3p“.

Interessanterweise war ein Großteil der differentiell exprimierten microRNAs ausschließlich in behandelten TAC-Tieren ( $TAC_{RIO}$  vs.  $Sham_{RIO}$ ) signifikant verändert (Tab. 4.7, unterer Teil). Ob hierbei ein auf RIO zurückzuführender Einfluss konstatiert werden kann, bleibt dabei aber schwer einzuschätzen. Die Richtung und Stärke der Expressionen ( $\uparrow$ ,  $\downarrow$ ) waren meist gleich und ähnlich stark im Vergleich zu  $TAC_{LM}$  vs.  $Sham_{LM}$ , wenn auch nicht signifikant.



**Tabelle 4.7: Detaillierte Auflistung der microRNAs, die als signifikant verändert identifiziert wurden.** Die Tabelle listet alle signifikant veränderten ( $q < 0,05$ ) microRNAs der beiden Vergleiche  $TAC_{/LM}$  vs.  $Sham_{/LM}$  und  $TAC_{/RIO}$  vs.  $Sham_{/RIO}$ . Signifikante Veränderungen sind fettgedruckt hervorgehoben. (miR: reife und funktionsfähige – „mature“ – microRNAs)

<i>ausschließlich in <math>TAC_{/LM}</math> vs. <math>Sham_{/LM}</math> signifikant verändert (<math>n = 13</math>)</i>				
MIMAT ID	miR	Sequenz	$TAC_{/LM}$	$TAC_{/RIO}$
			vs. Sham <sub>/LM</sub>	vs. Sham <sub>/RIO</sub>
			Fold Change	
* MIMAT0014800	mmu-miR-1247-5p	ACCCGUCCCGUUCGUCCCGGAU	<b>2,85</b>	1,47
* MIMAT0009457	mmu-miR-1839-3p	AGACCUACUUAUCUACCAACAG	<b>1,86</b>	1,28
* MIMAT0000381	mmu-miR-34c-5p	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC	<b>1,80</b>	1,37
* MIMAT0000659	mmu-miR-212-3p	UAACAGUCUCCAGUCACGGCCA	<b>1,57</b>	1,34
* MIMAT0000530	mmu-miR-21a-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGAC	<b>1,50</b>	1,21
* MIMAT0000670	mmu-miR-222-3p	AGCUACAUCUGGCUACUGGGUCUC	<b>1,49</b>	1,37
* MIMAT0000904	mmu-miR-215-5p	AUGACCUAUGAUUUGACAGACC	<b>1,46</b>	-1,05
* MIMAT0004704	mmu-miR-335-3p	UUUUUCAUUUUGCUCCUGACC	<b>1,41</b>	1,15
* MIMAT0014843	mmu-miR-3068-3p	GGUGAAUUGCAGUACUCCAACA	<b>1,39</b>	1,13
* MIMAT0005440	mmu-miR-24-2-5p	GUGCCUACUGAGCUGAAACAG	<b>1,28</b>	1,24
* MIMAT0000521	mmu-let-7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGU	<b>-1,22</b>	-1,15
* MIMAT0000742	mmu-miR-378a-5p	CUCCUGACUCCAGGUCCUGUGU	<b>-1,31</b>	-1,03
* MIMAT0000663	mmu-miR-218-5p	UUGUGCUUGAUCUAACCAUGUG	<b>-1,84</b>	-1,43

<i>gemeinsam in <math>TAC_{/LM}</math> vs. <math>Sham_{/LM}</math> und <math>TAC_{/RIO}</math> vs. <math>Sham_{/RIO}</math> signifikant verändert (<math>n = 30</math>)</i>				
MIMAT ID	miR	Sequenz	$TAC_{/LM}$	$TAC_{/RIO}$
			vs. Sham <sub>/LM</sub>	vs. Sham <sub>/RIO</sub>
			Fold Change	
* MIMAT0004939	mmu-miR-208b-3p	AUAAGACGAACAAAAGGUUUG	<b>9,15</b>	<b>6,49</b>
* MIMAT0009455	mmu-miR-1983	CUCACCUUGAGCAUGUUUUCU	<b>5,18</b>	<b>4,05</b>
MIMAT0000246	mmu-miR-122-5p	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	<b>5,18</b>	<b>13,36</b>
* MIMAT0027789	mmu-miR-6944-3p	UAACUCUCCCUUGUGCCCUCAG	<b>2,90</b>	<b>2,82</b>
* MIMAT0029906	mmu-miR-7688-5p	UAGCUGGGCAUGAUCUGAUGAGC	<b>2,80</b>	<b>2,13</b>
MIMAT0005292	mmu-miR-582-3p	AACCUGUUGAACACUGAACCC	<b>2,01</b>	<b>4,18</b>
MIMAT0003509	mmu-miR-501-3p	AAUGCACCCGGGCAAGGAUUUGA	<b>1,99</b>	<b>2,07</b>
* MIMAT0000229	mmu-miR-199a-5p	CCCAGUGUUCAGACUACCUGU	<b>1,95</b>	<b>1,73</b>

* MIMAT0004664	mmu-miR-214-5p	UGCCUGUCUACACUUGCUGUGA	1,81	1,65
* MIMAT0000661	mmu-miR-214-3p	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU	1,81	1,58
MIMAT0003173	mmu-miR-547-3p	CUUGGUACAUCUUUGAGUGAGU	1,74	2,26
MIMAT0000132	mmu-miR-99b-5p	CACCCGUAGAACCGACCUUGCGA	1,72	1,81
* MIMAT0003453	mmu-miR-497a-5p	CAGCAGCACACUGUGGUUUGUA	1,65	1,54
MIMAT0000225	mmu-miR-195a-5p	UAGCAGCACAGAAUUAUUGGCA	1,59	1,63
* MIMAT0000126	mmu-miR-27b-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	1,47	1,23
MIMAT0000125	mmu-miR-23b-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUACCACU	1,38	1,48
MIMAT0000669	mmu-miR-221-3p	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC	1,35	1,48
MIMAT0000219	mmu-miR-24-3p	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	1,28	1,45
MIMAT0000135	mmu-miR-125a-5p	UCCCUGAGACCCUUUAACCUAG	1,26	1,34
MIMAT0000525	mmu-let-7f-5p	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGU	-1,21	-1,28
* MIMAT0000383	mmu-let-7d-5p	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU	-1,24	-1,23
MIMAT0000647	mmu-miR-107-3p	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUC	-1,27	-1,43
MIMAT0000515	mmu-miR-30d-5p	UGUAAACAUCCCGACUGGAAGC	-1,31	-1,45
* MIMAT0017206	mmu-miR-486a-3p	CGGGGCAGCUCAGUACAGGAUG	-1,36	-1,33
MIMAT0000660	mmu-miR-181a-1-3p	ACCAUCGACCGUUGAUUGUACC	-1,37	-1,44
MIMAT0000129	mmu-miR-30a-3p	CUUUCAGUCGGAUGUUUGCAGC	-1,40	-1,46
MIMAT0017068	mmu-miR-181c-3p	ACCAUCGACCGUUGAGUGGACC	-1,44	-1,67
MIMAT0005443	mmu-miR-181a-2-3p	ACCACCGACCGUUGACUGUACC	-1,59	-1,91
MIMAT0000142	mmu-miR-9-5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	-1,89	-2,20
* MIMAT0036462	mmu-miR-9769-3p	UAGGGUCUGUUCUGUGUCCUCC	-2,88	-2,28

ausschließlich in  $TAC_{RIO}$  vs.  $Sham_{RIO}$  signifikant verändert ( $n = 32$ )

MIMAT ID	miR	Sequenz	$TAC_{LM}$	$TAC_{RIO}$
			vs. Sham <sub>LM</sub>	vs. Sham <sub>RIO</sub>
			Fold Change	
MIMAT0005291	mmu-miR-582-5p	AUACAGUUGUUCAACCAGUUAC	1,81	5,19
MIMAT0019352	mmu-miR-3968	AUCCACUCCUGACACCA	1,15	2,19
MIMAT0000218	mmu-miR-24-1-5p	GUGCCUACUGAGCUGAUUUCAG	1,40	2,02
MIMAT0000672	mmu-miR-199b-5p	CCCAGUGUUUAGACUACCUGUUC	1,49	1,97
MIMAT0031420	mmu-miR-8114	UCACCCAUCUCCUCUCCGCCUCG	1,66	1,66
MIMAT0000766	mmu-miR-335-5p	UCAAGAGCAAUAACGAAAAAUG	1,32	1,58
MIMAT0017060	mmu-miR-221-5p	ACCUGGCAUACAAUGUAGAUUUC	1,53	1,52

MIMAT0000520	mmu-miR-208a-3p	AUAAGACGAGCAAAAAGCUUG	1,08	<b>1,48</b>
MIMAT0000379	mmu-miR-301a-3p	CAGUGCAAUAGUUAUUGUCAAAAGC	1,14	<b>1,45</b>
MIMAT0004894	mmu-miR-574-3p	CACGCUCAUGCACACACCCACA	1,15	<b>1,44</b>
MIMAT0000571	mmu-miR-331-3p	GCCCCUGGGCCUAUCCUAGAAA	1,04	<b>1,42</b>
MIMAT0003482	mmu-miR-499-5p	UUAAGACUUGCAGUGAUGUUUA	1,07	<b>1,34</b>
MIMAT0004616	mmu-miR-30c-1-3p	CUGGGAGAGGGUUGUUUACUCC	-1,22	<b>-1,27</b>
MIMAT0003781	mmu-miR-676-5p	ACUCUACAACCUUAGGACUUGCA	1,03	<b>-1,33</b>
MIMAT0009456	mmu-miR-1839-5p	AAGGUAGAUAGAACAGGUCUUG	1,08	<b>-1,35</b>
MIMAT0000128	mmu-miR-30a-5p	UGUAAACAUCUCGACUGGAAGC	-1,22	<b>-1,36</b>
MIMAT0000539	mmu-miR-92a-3p	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGUAA	-1,29	<b>-1,40</b>
MIMAT0004324	mmu-miR-181d-5p	AACAUUCAUUGUUGUCGGUGGG	-1,25	<b>-1,42</b>
MIMAT0001422	mmu-miR-434-3p	UUUGAACCAUCACUCGACUCC	-1,17	<b>-1,45</b>
MIMAT0004617	mmu-miR-148a-5p	AAAGUUCUGAGACACUCCGACU	-1,25	<b>-1,45</b>
MIMAT0005438	mmu-miR-30c-2-3p	CUGGGAGAAGGCUGUUUACUCU	-1,27	<b>-1,47</b>
MIMAT0000210	mmu-miR-181a-5p	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAG	-1,20	<b>-1,50</b>
MIMAT0003151	mmu-miR-378a-3p	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGGC	-1,27	<b>-1,50</b>
MIMAT0000211	mmu-miR-182-5p	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACCG	-1,26	<b>-1,51</b>
MIMAT0016982	mmu-miR-128-1-5p	CGGGGCCGUAGCACUGUCUGAGA	-1,07	<b>-1,56</b>
MIMAT0000746	mmu-miR-381-3p	UAUACAAGGGCAAGCUCUCUGU	-1,41	<b>-1,56</b>
MIMAT0000249	mmu-miR-30e-3p	CUUUCAGUCGGAUGUUUACAGC	-1,40	<b>-1,56</b>
MIMAT0000743	mmu-miR-379-5p	UGGUAGACUAUGGAACGUAGG	-1,01	<b>-1,61</b>
MIMAT0049851	mmu-miR-12191-3p	CCCAUGGAGCUGUAGGAGCCG	-1,14	<b>-1,66</b>
MIMAT0014822	mmu-miR-3057-5p	AUUGGAGCUGAGAUUCUGCGGGAU	1,04	<b>-1,66</b>
MIMAT0000673	mmu-miR-181b-5p	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGG	-1,32	<b>-1,68</b>
MIMAT0004852	mmu-miR-190b-5p	UGAUUAUGUUUGAUUAUUGGGUUG	-1,60	<b>-1,90</b>

\* microRNAs die eine Abschwächung/Revertierung nach RIO-Behandlung zeigten

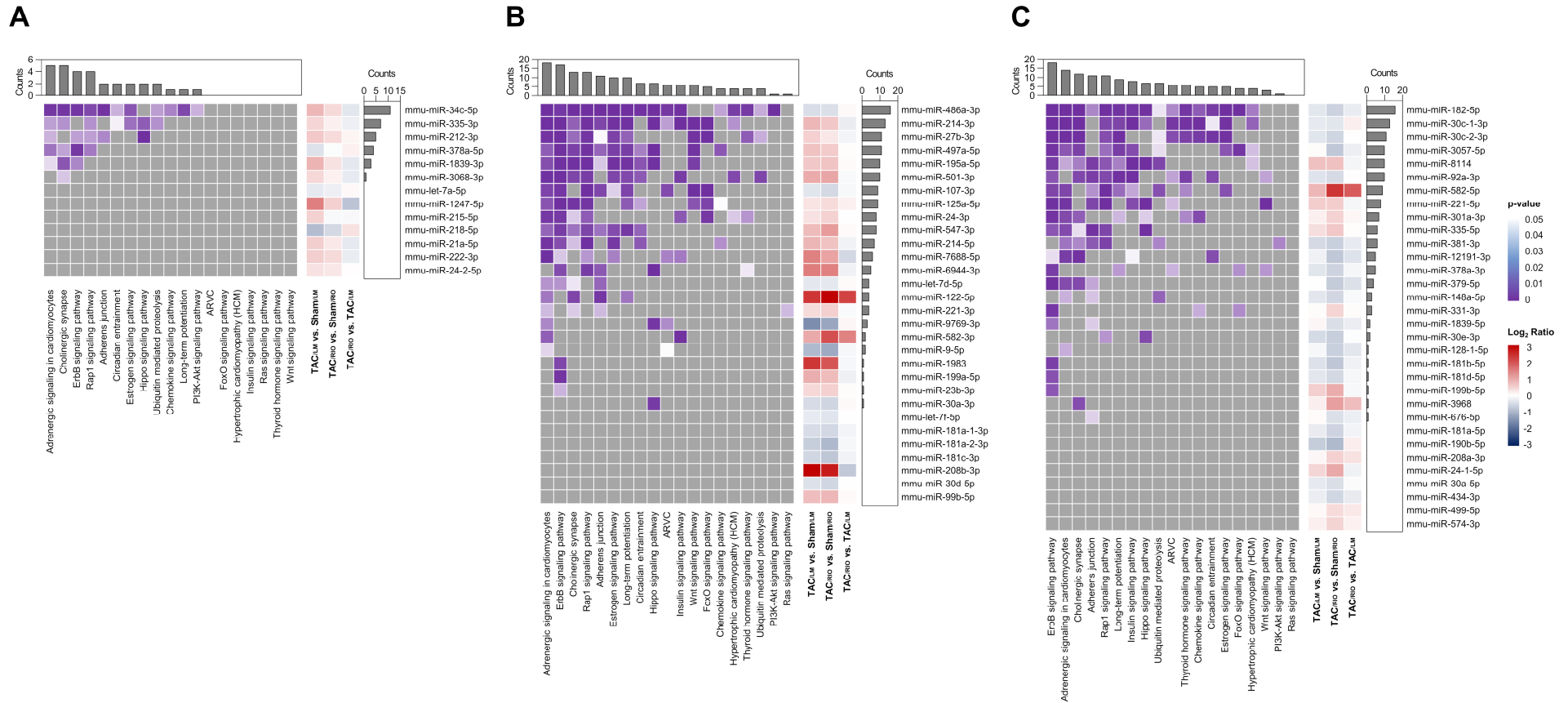
## 4.5.2 Funktionelle Klassifizierung differentiell exprimierter microRNAs

Für eine funktionelle Einordnung der signifikant veränderten microRNAs ( $q < 0,05$ ) wurden microRNA-zu-Pathway Analysen unter Verwendung der *microRNA Pathway Dictionary Database* (miRPathDB v2.0) durchgeführt. Eine Aufteilung der entsprechenden microRNAs zusammen mit ihrer Zuordnung zu assoziierten Signalwegen erfolgte analog zu den vorangegangenen Darstellungen. So zeigt Abbildung 4.34 eine Einteilung in: (A) ausschließlich in  $TAC_{/LM}$  vs.  $Sham_{/LM}$  signifikant veränderte microRNAs, (B) gemeinsam in  $TAC_{/LM}$  vs.  $Sham_{/LM}$  und  $TAC_{/RIO}$  vs.  $Sham_{/RIO}$  signifikant veränderte microRNAs, und (C) ausschließlich in  $TAC_{/RIO}$  vs.  $Sham_{/RIO}$  signifikant veränderte microRNAs.

Insgesamt wurden 19 Signalwege mit Bezug zu CVDs identifiziert, in denen mindestens eine oder mehrere der differentiell exprimierten microRNAs eine Rolle spielen. Den Kategorien *Adrenergic Signaling in Cardiomyocytes*, *ErbB Signaling*, und *Cholinergic Synapse* wurden die meisten microRNAs zugeordnet (Abb. 4.34). Bei den microRNAs mit einer Funktion in multiplen Signalwegen handelte es sich insbesondere um „miR-34c-5p“ (Abb. 4.34A), „miR-486a-3p“ (Abb. 4.34B), und „miR-182-5p“ (Abb. 4.34C).

Aufgrund der hauptsächlich inhibierenden Funktionsweise von microRNAs auf post-transkriptionaler Ebene sind diejenigen mit erhöhter Expression nach TAC von besonderem Interesse. Allerdings konnten für besonders interessante Kandidaten (u.a. „miR-1247-5p“, „miR-208b-3p“) nach bestehender Datenlage keine Assoziationen zu CVDs gefunden werden, während diese für die eben erwähnten microRNAs „miR-34c-5p“, „miR-27b-3p“ oder „miR-214-3p“ belegt sind (Abb. 4.34).

Daneben wurde auch nach Medikation eine Regulation von microRNAs verzeichnet. So wurde die nach TAC erhöhte Expression von „miR-24-3p“, „miR-122-5p“, „miR-547-3p“, und „miR-582-3p“ nach RIO-Gabe weiter erhöht. Andererseits wurde die geringere Expression von „miR-9-5p“ und „miR-30“ nach TAC durch Medikation in TAC-Tieren weiter reduziert. Besonders interessant ist, dass einige kürzlich beschriebene microRNAs (z.B. „miR-6944-3p“, „miR-7688-5p“, „miR-9769-3p“) nach TAC in ihrer Expression verändert waren und eine Revertierung der Expression nach RIO-Behandlung aufwiesen.



**Abb. 4.34: microRNA-zu-Pathway Assoziationen zwischen differentiell exprimierten microRNAs und CVD relevanten Signalwegen.** Dargestellt sind alle signifikant veränderten ( $q < 0,05$ ) microRNAs der beiden Vergleiche TAC<sub>ILM</sub> vs. Sham<sub>ILM</sub> und TAC<sub>RIO</sub> vs. Sham<sub>RIO</sub> zusammen mit ihren Assoziationen zu wichtigen CVD relevanten Signalwegen (miRPathDB v.2.0). Die Signalwege sind nach der Anzahl der assoziierten microRNAs geordnet (oberes Balkendiagramm), die microRNAs nach der Anzahl der Signalwege, in denen sie einen Einfluss haben könnten (rechtes Balkendiagramm). Expressionsveränderungen zwischen den verschiedenen Bedingungen sind als log<sub>2</sub>-Ratios angegeben. Rotfärbung kennzeichnet eine Zunahme, Blaufärbung eine Abnahme der Expression. Signifikante microRNA-Pathway Assoziationen sind violett bis weiß markiert (p-Wert). **(A)** Ausschließlich in TAC<sub>ILM</sub> vs. Sham<sub>ILM</sub> signifikant veränderte microRNAs (n = 13). **(B)** Gemeinsam in TAC<sub>ILM</sub> vs. Sham<sub>ILM</sub> und TAC<sub>RIO</sub> vs. Sham<sub>RIO</sub> signifikant veränderte microRNAs (n = 30). **(C)** Ausschließlich in TAC<sub>RIO</sub> vs. Sham<sub>RIO</sub> signifikant veränderte microRNAs (n = 32).

### 4.5.3 Vergleichende funktionelle Analyse von microRNA- und Transkriptomdaten

IPA®'s microRNA Target Filter wurde verwendet, um potentielle Zieltranskripte (*Targets*) in den RNA-Seq Daten zu identifizieren. Aufgrund des hauptsächlich inhibitorischen Mechanismus von microRNAs auf post-transkriptionaler Ebene wurden Transkriptom- und microRNA-Datensätze kombiniert und inverse Expressionspaarungen ermittelt. Entsprechende microRNA-mRNA-Interaktionen wurde priorisiert und nach biologischen Kriterien gefiltert. Da einige wenige microRNAs mehrere tausend *Targets* zum Ziel haben können, sind solche Filterschritte essenziell, um die immense Datenmenge zu verringern und gezielte Fragestellungen beantworten zu können, z.B. in welchem Gewebe, welche *Pathways* oder Erkrankungen durch microRNAs angesteuert und/oder beeinflusst werden. Anschließend ist eine Visualisierung dieser Prozesse und Signalwege möglich, indem auf zuvor bereits beschriebene Weise die entsprechenden mRNA-*Targets* funktionell analysiert und klassifiziert werden.

Nachfolgende Tabelle 4.8 fasst die verschiedenen Schritte und Anpassungen der microRNA Target Filter Analyse, die für die vorliegenden Untersuchungen relevant waren, zusammen. Aus der generellen microRNA-Identifizierung und relativen Quantifizierung (Abschnitt 4.5.1) ergaben sich zwei Datensätze mit signifikant veränderten microRNAs der Vergleiche TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub> und TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub>, die analysiert wurden. Als *Target*-Datensätze wurden entsprechend identifizierte und quantifizierte mRNAs, ebenfalls aus den Vergleichen TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub> und TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub> der RNA-Seq Analysen verwendet (Abschnitt 4.2.1, Anhang S1). Nach einer Priorisierung von inversen microRNA-mRNA-Paarungen wurde zusätzlich nach herzwegebespezifischen *Targets* mit CVD-Assoziation gefiltert.

**Tabelle 4.8: Detaillierte Auflistung der Anpassungen und Einstellungen für die microRNA Target Filter Analyse in IPA®.** Die Tabelle listet alle Spezifikationen des microRNA Target Filter *Workflows* auf.

Upload	Identifikation	Priorisierung	Filtern	Visualisierung
aller signifikant veränderten microRNAs ( $q < 0,05$ ) beider Gruppenvergleiche	von mRNA- <i>Targets</i> anhand der experimentellen RNA-Seq Daten aus den vorherigen Genexpressionsanalysen	Begrenzung auf inverse Expressionspaarungen zwischen microRNAs und mRNA- <i>Targets</i> : ↑↓: microRNA hoch (↑), mRNA runter (↓) ↓↑: microRNA runter (↓), mRNA hoch (↑)	Biologische Filterkriterien: a) Spezifität: Herzgewebe b) Assoziation zu CVDs	Funktionelle Klassifizierung der ermittelten mRNA- <i>Targets</i> beider Datensets

Von den 43 in TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub> veränderten microRNAs wurden unter Verwendung eben erwähnter *Workflow*-Spezifikationen 30 microRNAs identifiziert, die mit insgesamt 1536 bzw. 560 signifikant veränderten ( $q < 0,05$ ), herzrelevanten mRNA-*Targets* inverse Expressionspaarungen aufwiesen. Von den 62 in TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub> veränderten microRNAs wurden 40 identifiziert, mit insgesamt 1747 bzw. 514 ( $q < 0,05$ ) inversen mRNA-*Targets* (Tab. 4.9).

**Tabelle 4.9: Anzahl identifizierter mRNA-*Targets* anhand der Transkriptomdaten aus IPA®'s microRNA Target Filter Analyse.** Die Tabelle listet die Anzahl inverser microRNA-mRNA-Expressionspaarungen unter Berücksichtigung der angewendeten Einstellungen des microRNA Target Filter *Workflows* auf.

Gruppenvergleich	microRNAs (Upload, $q < 0,05$ )	microRNAs nach Priorisierung und Filtern	mRNA- <i>Targets</i> aus RNA-Seq Datensatz	
			ohne <i>Cutoff</i>	$q < 0,05$
TAC <sub>/LM</sub> vs. Sham <sub>/LM</sub>	43	30	1536	560
TAC <sub>/RIO</sub> vs. Sham <sub>/RIO</sub>	62	40	1747	514

Eine vollständige Auflistung dieser microRNAs und deren *Targets*, zusammen mit den entsprechenden Expressionsänderungen und Expressionspaarungen ist dem **Anhang S7** zu entnehmen.

Eine anschließende z-Score Analyse der identifizierten mRNA-*Targets* gab Aufschluss über Signalwege und biologische Prozesse, die unter dem Einfluss einer Regulation durch microRNAs stehen können (Tab. 4.10). Vor allem *GP6 Signaling* als kardiale Stressantwort und gewebe- und strukturspezifische Signalwege (*Integrin Signaling*, *Actin Cytoskeleton Signaling*, *Organization of Cytoskeleton*) zeigten sich aufgrund von TAC signifikant aktiviert in unbehandelten Tieren (TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>). Gleichzeitig wurde eine Aktivierung des Prozesses *Apoptosis of Cardiomyocytes* hervorgehoben. Einen starken Einfluss schienen microRNAs auf mRNA-*Targets* zu haben, die energiemetabolischen Prozessen (*TCA Cycle*) sowie intrazellulären und *Second Messenger* Signalwegen (*AMPK Signaling*, *Calcium Signaling*) zuzuordnen sind. Wie auch *eNOS Signaling* als wichtiger kardiovaskulärer Signalweg zeigten diese Signalwege eine microRNA-assoziierte Hemmung. Die stärkste Inhibierung zeigte sich für die Kategorie *PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$  Activation*.

Vergleicht man dem gegenübergestellt die Veränderungen in behandelten TAC-Tieren (TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub>), schienen microRNAs keinen Einfluss mehr auf die eben beschriebenen Funktionen und Signalwege zu haben. Mit Ausnahme von *GP6 Signaling* und *Organization of Cytoskeleton* wurden offenbar keine bzw. nicht genügend *Targets* identifiziert, die eine signifikante Aktivierung bzw. Inhibierung entsprechend dargestellter Signalwege hervorgehoben hätten.

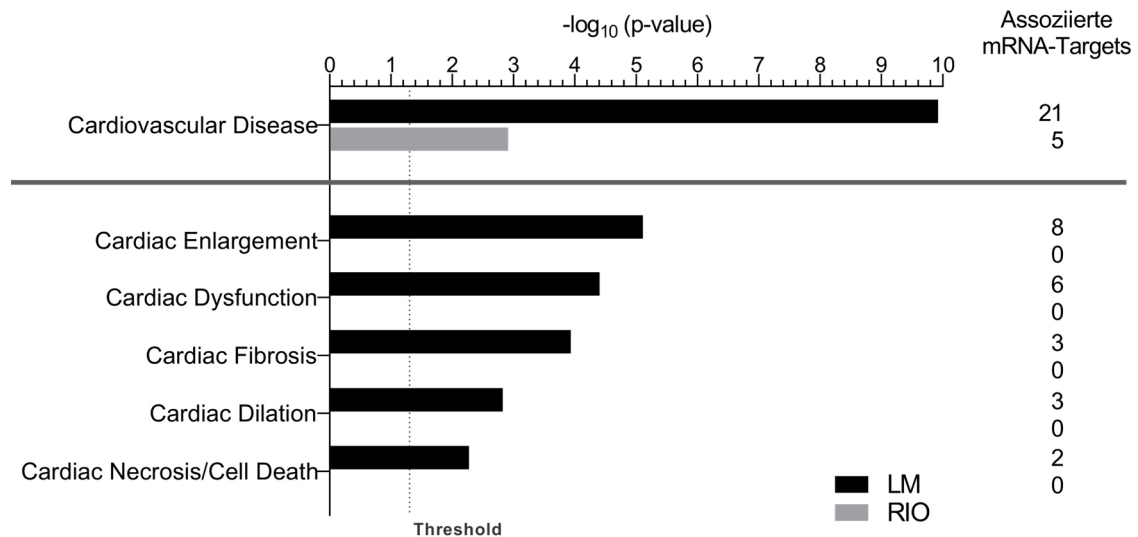
Interessanterweise zeigte sich allerdings eine microRNA-assoziierte Hemmung der Kategorie *Concentration of Fatty Acids* nach Behandlung.

**Tabelle 4.10: Wichtige Signalwege und Funktionen, die nach Datenlage u.a. durch microRNAs reguliert werden können.** Die Tabelle listet Signalwege und Prozesse zusammen mit deren Aktivierung bzw. Inhibierung nach einer z-Score Analyse von signifikanten DEGs ( $q < 0,05$ ) auf, die zuvor durch inverse Expressionspaarung als *Targets* einer microRNA-mRNA-Interaktion identifiziert wurden. Signifikante z-Scores sind fettgedruckt hervorgehoben, wobei  $z \geq 2$  signifikante Aktivierung und  $z \leq -2$  signifikante Inhibierung anzeigt.

Analyse und Annotation	TAC <sub>/LM</sub>	TAC <sub>/RIO</sub>
	vs. Sham <sub>/LM</sub>	vs. Sham <sub>/RIO</sub>
	z-Score	
<i>Canonical Pathways</i>		
Integrin Signaling	<b>2,36</b>	0,23
GP6 Signaling Pathway	<b>2,31</b>	<b>2,12</b>
Actin Cytoskeleton Signaling	<b>2,00</b>	-0,23
TCA Cycle	<b>-2,24</b>	-
eNOS Signaling	<b>-2,45</b>	1,00
AMPK Signaling	<b>-2,50</b>	0,58
Calcium Signaling	<b>-2,71</b>	-0,45
PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$ Activation	<b>-2,98</b>	-1,79
<i>Biological Functions</i>		
Organization of Cytoskeleton	<b>2,01</b>	<b>2,46</b>
Apoptosis of Cardiomyocytes	<b>2,11</b>	0,72
Concentration of Fatty Acids	-	<b>-2,06</b>

Analog zur z-Score Analyse wurden identifizierte mRNA-*Targets* mittels IPA® ebenfalls nach ihrer Zuordnung zu kardiovaskulären Erkrankungen und CVD assoziierten Kardiotoxizitätsfunktionen untergliedert. Abbildung 4.35 stellt die zugeordneten *Targets* mit relevanter inverser microRNA-mRNA-Interaktion der beiden Gruppen TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub> und TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub> gegenüber.

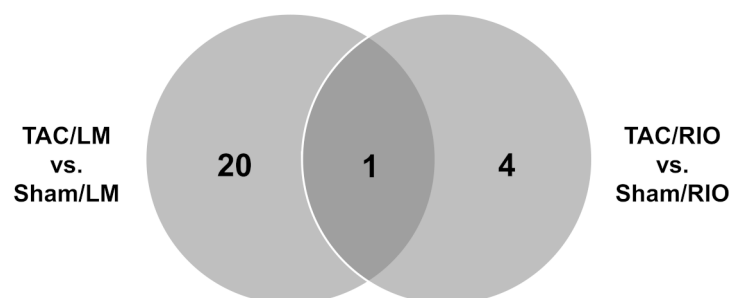




**Abb. 4.35: Zuordnung signifikant veränderter mRNA-Targets zu kardiovaskulären Erkrankungen und wichtigen CVD assoziierten Kardiotoxizitätsfunktionen.** Das Balkendiagramm stellt die Signifikanz der Überrepräsentation der funktionellen Kategorie als negative log-transformierte p-Werte dar. Abgebildet sind die am stärksten beeinflussten CVD assoziierten Signalwege unter der Oberkategorie kardiovaskulärer Erkrankungen, zusammen mit der Anzahl assoziierter mRNA-Targets mit signifikanter 2facher Expressionsänderung. ( $q < 0,05$ ;  $FC \geq |2|$ ; LM: Lösungsmittelgabe; RIO: Riociguatmedikation).

Eine deutlich stärkere Anreicherung in der Kategorie CVD zeigte sich für signifikant veränderte mRNA-Targets ( $q < 0,05$ ;  $FC \geq |2|$ ) in  $TAC_{/LM}$  vs.  $Sham_{/LM}$  mit 21 assoziierten Targets im Vergleich zu  $TAC_{/RIO}$  vs.  $Sham_{/RIO}$  mit nur 5 assoziierten Targets. Betrachtet man die dazugehörigen Kardiotoxizitätsfunktionen, fanden sich keine der 5 Zielgene aus  $TAC_{/RIO}$  vs.  $Sham_{/RIO}$  in diesen Kategorien wieder (Abb. 4.35).

Das Venn-Diagramm (Abb. 4.36) zeigt die geringe Schnittmenge dieser 21 ( $TAC_{/LM}$  vs.  $Sham_{/LM}$ ) und 5 ( $TAC_{/RIO}$  vs.  $Sham_{/RIO}$ ) CVD assoziierten mRNA-Targets mit nur einem Target (*Acta1*).



**Abb. 4.36: Überschneidung CVD assoziierter mRNA-Targets der microRNA Target Filter Analyse mit 2facher Expressionsveränderung.** Dargestellt ist die Anzahl der DEGs, die durch inverse Expressionspaarung als Targets einer microRNA-mRNA-Interaktion identifiziert wurden und mindestens eine 2fache Expressionsänderung aufgrund der Aortenkonstriktion in Lösungsmittel ( $TAC_{/LM}$  vs.  $Sham_{/LM}$ ) und Riociguat ( $TAC_{/RIO}$  vs.  $Sham_{/RIO}$ ) behandelten Tieren aufwiesen, zusammen mit deren Schnittmenge. ( $q < 0,05$ ,  $FC \geq |2|$ )

Die nachfolgenden Tabellen 4.11 A und B listen die insgesamt 25 CVD assoziierten mRNA-*Targets*, zusammen mit deren potentiellen microRNA-Interaktionspartnern, auf. Auffällig war, dass die meisten identifizierten *Targets* mehrere microRNA-Interaktionspartner aufwiesen. Für die verschiedenen Kollagene (*Col1a1*, *Col4a1*, *Col8a1*, *Col15a1*) wurden z.B. insgesamt vier verschiedene microRNAs identifiziert, wobei „let-7d-5p“ als potentieller Interaktionspartner für jedes dieser Kollagene in Frage kommt (Tab. 4.11A). Des Weiteren zeigte sich, dass nur einige wenige microRNAs mit allen *Targets* eine inverse Expressionspaarung zeigen. In TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub> waren nur 8 microRNAs mögliche Interaktionspartner zu den insgesamt 21 Zieltranskripten, wobei eben erwähnte „let-7d-5p“ mit 10 mRNAs die meisten *Targets* aufwies (Tab. 4.11A). In TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub> wurden hingegen 7 microRNAs mit inverser Expressionspaarung zu den 5 entsprechenden mRNAs identifiziert (Tab. 4.11B). Bei dem zuvor erwähnten *Target* in der Schnittmenge beider Vergleiche handelte es sich um *Acta1*, wobei verschiedene microRNAs als Interaktionspartner in den Gruppen identifiziert wurden. Hierbei handelte es sich um microRNAs aus der gleichen Familie (let-7), „let-7d-5p“ (TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>, Tab. 4.11A) und „let-7f-5p“ (TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub>, Tab. 4.11B), welche die gleiche Seed-Sequenz tragen und dadurch auch mit großer Wahrscheinlichkeit mit den gleichen *Targets* interagieren können. Interessanterweise zeigten die meisten der identifizierten microRNA-mRNA-Interaktionen eine unerwartete inverse Expressionspaarung von erhöhter Genexpression und verringerter microRNA-Expression.



**Tabelle 4.11A: Inverse Expressionspaarungen der 21 in TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub> identifizierten CVD assoziierten mRNA-Targets und deren zugeordneten microRNAs.** Die Tabelle listet die 21 CVD assoziierten Targets aus TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub> auf, die eine inverse Expressionspaarung als microRNA-mRNA-Interaktion aufwiesen. (\* **Seed-Sequenzen** sind fettgedruckt dargestellt; miR: reife und funktionsfähige – „mature“ – microRNAs)

TAC <sub>/LM</sub> vs. Sham <sub>/LM</sub> (21 mRNA-Targets, 8 microRNAs)								
mRNA-Target Informationen				microRNA Informationen				
Gen ID	Entrez ID	Genbeschreibung	FC	Expressions- paarung	FC	miR	MIMAT ID	Sequenz *
Abra	223513	Actin-binding Rho activating protein	3,09	↑↓	-1,84	mmu-miR-218-5p	MIMAT0000663	UUGUGCUUGAUCUAACCAUGUG
Acta1	11459	Actin, alpha 1, skeletal muscle	8,75	↑↓	-1,24	mmu-let-7d-5p	MIMAT0000383	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU
Adam12	11489	A disintegrin and metallopeptidase domain 12	2,32	↑↓	-1,31	mmu-miR-30d-5p	MIMAT0000515	UGUAAACAUCCCCGACUGGAAGC
Ankrd1	107765	Ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)	2,89	↑↓	-1,84	mmu-miR-218-5p	MIMAT0000663	UUGUGCUUGAUCUAACCAUGUG
Amot	27494	Angiomotin	2,05	↑↓	-1,24	mmu-let-7d-5p	MIMAT0000383	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU
Amot	27494	Angiomotin	2,05	↑↓	-1,27	mmu-miR-107-3p	MIMAT0000647	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUC
Amot	27494	Angiomotin	2,05	↑↓	-1,36	mmu-miR-486a-3p	MIMAT0017206	CGGGGCAGCUCAGUACAGGAUG
Bgn	12111	Biglycan	2,21	↑↓	-1,36	mmu-miR-486a-3p	MIMAT0017206	CGGGGCAGCUCAGUACAGGAUG
Cdkn1a	12575	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	2,66	↑↓	-1,24	mmu-let-7d-5p	MIMAT0000383	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU
Cdkn1a	12575	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	2,66	↑↓	-1,36	mmu-miR-486a-3p	MIMAT0017206	CGGGGCAGCUCAGUACAGGAUG
Col15a1	12819	Collagen, type XV, alpha 1	2,30	↑↓	-1,24	mmu-let-7d-5p	MIMAT0000383	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU
Col15a1	12819	Collagen, type XV, alpha 1	2,30	↑↓	-1,89	mmu-miR-9-5p	MIMAT0000142	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA
Col1a1	12842	Collagen, type I, alpha 1	2,24	↑↓	-1,24	mmu-let-7d-5p	MIMAT0000383	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU
Col1a1	12842	Collagen, type I, alpha 1	2,24	↑↓	-1,31	mmu-miR-30d-5p	MIMAT0000515	UGUAAACAUCCCCGACUGGAAGC
Col1a1	12842	Collagen, type I, alpha 1	2,24	↑↓	-1,84	mmu-miR-218-5p	MIMAT0000663	UUGUGCUUGAUCUAACCAUGUG
Col4a1	12826	Collagen, type IV, alpha 1	2,40	↑↓	-1,24	mmu-let-7d-5p	MIMAT0000383	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU
Col4a1	12826	Collagen, type IV, alpha 1	2,40	↑↓	-1,31	mmu-miR-30d-5p	MIMAT0000515	UGUAAACAUCCCCGACUGGAAGC
Col8a1	12837	Collagen, type VIII, alpha 1	2,43	↑↓	-1,24	mmu-let-7d-5p	MIMAT0000383	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU
Col8a1	12837	Collagen, type VIII, alpha 1	2,43	↑↓	-1,31	mmu-miR-30d-5p	MIMAT0000515	UGUAAACAUCCCCGACUGGAAGC
Ctgf	14219	Connective tissue growth factor	2,31	↑↓	-1,31	mmu-miR-30d-5p	MIMAT0000515	UGUAAACAUCCCCGACUGGAAGC
Ctgf	14219	Connective tissue growth factor	2,31	↑↓	-1,84	mmu-miR-218-5p	MIMAT0000663	UUGUGCUUGAUCUAACCAUGUG
Eln	13717	Elastin	3,26	↑↓	-1,36	mmu-miR-486a-3p	MIMAT0017206	CGGGGCAGCUCAGUACAGGAUG

Fbn1	14118	Fibrillin 1	2,47	↑↓	-1,89	mmu-miR-9-5p	MIMAT0000142	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA
Itgb3	16416	Integrin beta 3	2,00	↑↓	-1,24	mmu-let-7d-5p	MIMAT0000383	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU
Nppa	230899	Natriuretic peptide type A	2,76	↑↓	-1,27	mmu-miR-107-3p	MIMAT0000647	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUC
P2rx1	18436	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1	2,04	↑↓	-1,24	mmu-let-7d-5p	MIMAT0000383	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU
Plagl1	22634	Pleiomorphic adenoma gene-like 1	-2,21	↓↑	2,01	mmu-miR-582-3p	MIMAT0005292	AACCGUUGAACACUGAACCC
Plagl1	22634	Pleiomorphic adenoma gene-like 1	-2,21	↓↑	1,66	mmu-miR-497a-5p	MIMAT0003453	CAGCAGCACACUGUGUUUGUA
Rcan1	54720	Regulator of calcineurin 1	2,50	↑↓	-1,27	mmu-miR-107-3p	MIMAT0000647	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUC
Sh3pxd2b	268396	SH3 and PX domains 2B	2,12	↑↓	-1,36	mmu-miR-486a-3p	MIMAT0017206	CGGGGCAGCUCAGUACAGGAUG
Vcan	13003	Versican	2,22	↑↓	-1,24	mmu-let-7d-5p	MIMAT0000383	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU
Vcan	13003	Versican	2,22	↑↓	-1,27	mmu-miR-107-3p	MIMAT0000647	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUC
Vcan	13003	Versican	2,22	↑↓	-1,31	mmu-miR-30d-5p	MIMAT0000515	UGUAAACAUCCCCGACUGGAAGC

**Tabelle 4.11B: Inverse Expressionspaarungen der 5 in  $TAC_{/RIO}$  vs.  $Sham_{/RIO}$  identifizierten CVD assoziierten mRNA-Targets und deren zugeordneten microRNAs.** Die Tabelle listet die 21 CVD assoziierten Targets aus  $TAC_{/RIO}$  vs.  $Sham_{/RIO}$  auf, die eine inverse Expressionspaarung als microRNA-mRNA-Interaktion aufwiesen. (\* **Seed-Sequenzen** sind fettgedruckt dargestellt; miR: reife und funktionsfähige – „mature“ – microRNAs)

<i>TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub> (5 mRNA-Targets, 7 microRNAs)</i>								
mRNA-Target Informationen				microRNA Informationen				
Gen ID	Entrez ID	Genbeschreibung	FC	Expressions-paarung	FC	miR	MIMAT ID	Sequenz
Acta1	11459	Actin, alpha 1, skeletal muscle	2,76	↑↓	-1,28	mmu-let-7f-5p	MIMAT0000525	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGU
Aqp4	11829	Aquaporin 4	-2,22	↓↑	5,19	mmu-miR-582-5p	MIMAT0005291	AUACAGUUGUUAACCAGUUAUC
Met	17295	Met proto-oncogene	2,04	↑↓	-1,51	mmu-miR-182-5p	MIMAT0000211	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACCG
Met	17295	Met proto-oncogene	2,04	↑↓	-1,45	mmu-miR-30d-5p	MIMAT0000515	UGUAAACAUCCCCGACUGGAAGC
Per1	18626	Period circadian clock 1	-2,01	↓↑	1,58	mmu-miR-214-3p	MIMAT0000661	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU
Per1	18626	Period circadian clock 1	-2,01	↓↑	1,45	mmu-miR-24-3p	MIMAT0000219	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG
Tnfrsf12a	27279	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a	2,02	↑↓	-1,56	mmu-miR-128-1-5p	MIMAT0016982	CGGGCCGUAGCACUGUCUGAGA

Aufgrund der hauptsächlich inhibierenden Funktionsweise von microRNAs auf post-transkriptionaler Ebene wurde eher der umgekehrte Fall von erhöhter microRNA-Expression und verringerter Genexpression erwartet. Dies zeigte sich jedoch nur an drei *Targets*. In TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub> war das der Fall für *Plagl1* mit den microRNAs „miR-582-3p“ und „miR-497a-5p“ (Tab. 4.11A). In TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub> galt dies für *Aqp4* mit „miR-582-5p“ und *Per1* mit „miR-214-3p“ und „miR-24-3p“ (Tab. 4.11B). Die stärkste Expressionserhöhung zeigte hierbei „miR-582-5p“ (FC = 5,19) mit gleichzeitig stärkster Expressionsverringering von *Aqp4* (FC = -2,22).

Um den Fokus noch detaillierter auf diese negativ korrelierte Ausrichtung einer inversen Regulation von microRNA (↑) und mRNA (↓) zu richten, wurden die zwei am stärksten veränderten microRNAs nach TAC im Vergleich zu Sham in unbehandelten und in RIO behandelten Tieren genauer betrachtet. Wie zuvor bereits in Tabelle 4.7 gezeigt, handelte es sich dabei um „miR-208b-3p“ (FC = 9,15) in TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub> und „miR-122-5p“ (FC = 13,36) in TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub>. Für beide microRNAs wurden 19 signifikant herunterregulierte mRNAs als Interaktionspartner, in den jeweils zugehörigen Genexpressionsdatensätzen der beiden Vergleichsgruppen identifiziert (Tab. 4.12A+B). In TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub> zeigten *Gabra1*, *Tmem47* und *Fgf2* die stärksten Expressionsverringeringungen (Tab. 4.12A). Hauptsächlich wurden nukleäre *Targets* als Ziel für „miR-208b-3p“ identifiziert (*Klf12*, *Nrip1*, *Pdcd4*, *Sybu*, *Zfp217*), aber auch mitochondriale (*Dld*, *Gstz1*, *Cisd2*) und Hypertrophie assoziierte (*Fgf2*, *Ppp3ca*). Die stärkste Verringerung der Expression in TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub> zeigten *Sned1*, *Slc4a3* und *Rbm38* (Tab. 4.12B). Für „miR-122-5p“ wurden hierbei ebenfalls meist nukleäre Transkripte als Ziel identifiziert, wie neben eben erwähntem *Rbm38* z.B. *Hopx*, *Meis2* und *Sumo3*. Zwei interessante *Targets* stellten *Myosin light chain 3 (Myl3)* und kardiales Troponin T (*Tnnt2*) dar, da diese mit HCM und DCM bei chronischer Herzinsuffizienz assoziiert sind.

**Tabelle 4.12A: microRNA mit der höchsten Expression in TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub> und ihre invers regulierten mRNA-Targets.** Die Tabelle listet miR-208b-3p als die microRNA mit der stärksten Zunahme nach TAC in unbehandelten Tieren (TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>) auf. Darunter sind alle signifikant invers regulierten Targets der microRNA Target Filter Analyse und deren *Fold Changes* dargestellt.

<i>microRNA mit der höchsten Expression in TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub></i>				
MIMAT ID	miR	Sequenz	Fold Change	
MIMAT0004939	mmu-miR-208b-3p	AUAAGACGAACAAAAGGUUUG	9,15	

<i>mRNA-Targets in TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub></i>				
Entrez ID	Genbeschreibung	Gen ID	q-Wert	Fold Change
14394	Gamma-aminobutyric acid A receptor, subunit alpha 1	Gabra1	1,94E-03	-1,92
192216	Transmembrane protein 47	Tmem47	5,32E-11	-1,53
14173	Fibroblast growth factor 2	Fgf2	8,55E-03	-1,50
74365	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 3	Lonrf3	1,79E-02	-1,49
319613	Syntabulin	Sybu	1,88E-07	-1,47
228913	Zinc finger protein 217	Zfp217	5,87E-04	-1,29
12296	Calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit	Cacnb2	3,87E-03	-1,27
16597	Kruppel-like factor 12	Klf12	1,31E-03	-1,26
268903	Nuclear receptor interacting protein 1	Nrip1	2,09E-02	-1,23
216742	Folliculin interacting protein 1	Fnip1	1,95E-02	-1,22
13382	Dihydrolipoamide dehydrogenase	Dld	1,32E-03	-1,20
67006	CDGSH iron sulfur domain 2	Cisd2	1,09E-03	-1,17
18569	Programmed cell death 4	Pdcd4	5,73E-03	-1,17
218613	MIER family member 3	Mier3	1,69E-02	-1,17
14874	Glutathione transferase zeta 1	Gstz1	1,83E-03	-1,15
98386	Lamin B receptor	Lbr	1,82E-02	-1,13
66661	Signal recognition particle 72	Srp72	7,38E-03	-1,12
19055	Protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform	Ppp3ca	3,03E-02	-1,12
74022	Glyoxylate reductase 1 homolog	Glyr1	3,77E-02	-1,06

**Tabelle 4.12B: microRNA mit der höchsten Expression in TAC<sub>RIO</sub> vs. Sham<sub>RIO</sub> und ihre invers regulierten mRNA-Targets.** Die Tabelle listet miR-122-5p als die microRNA mit der stärksten Zunahme nach TAC in behandelten Tieren (TAC<sub>RIO</sub> vs. Sham<sub>RIO</sub>) auf. Darunter sind alle signifikant invers regulierten Targets der microRNA Target Filter Analyse und deren *Fold Changes* dargestellt.

<i>microRNA mit der höchsten Expression in TAC<sub>RIO</sub> vs. Sham<sub>RIO</sub></i>				
MIMAT ID	miR	Sequenz	Fold Change	
MIMAT0000246	mmu-miR-122-5p	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	13,36	

<i>mRNA-Targets in TAC<sub>RIO</sub> vs. Sham<sub>RIO</sub></i>				
Entrez ID	Genbeschreibung	Gen ID	q-Wert	Fold Change
208777	Sushi, nidogen and EGF-like domains 1	Sned1	2,89E-06	-1,77
20536	Solute carrier family 4 (anion exchanger), member 3	Slc4a3	5,80E-05	-1,52
56190	RNA binding motif protein 38	Rbm38	1,27E-03	-1,50
66824	PYD and CARD domain containing	Pycard	1,23E-08	-1,47
211770	Tribbles pseudokinase 1	Trib1	2,43E-06	-1,44
330908	Opioid binding protein/cell adhesion molecule-like	Opcml	5,36E-03	-1,38
74318	HOP homeobox	Hopx	1,29E-04	-1,36
13511	Desmoglein 2	Dsg2	1,66E-07	-1,31
17897	Myosin, light polypeptide 3	Myl3	6,45E-03	-1,31
622675	Zinc finger protein 827	Zfp827	3,98E-03	-1,30
11987	Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1	Slc7a1	2,37E-02	-1,28
20661	Sortilin 1	Sort1	7,94E-04	-1,26
21956	Troponin T2, cardiac	Tnnt2	5,98E-04	-1,20
17536	Meis homeobox 2	Meis2	4,10E-02	-1,17
29809	RAB GTPase activating protein 1-like	Rabgap1l	1,06E-03	-1,16
170718	Isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) beta	Idh3b	6,59E-04	-1,15
69585	Hemochromatosis type 2 (juvenile)	Hfe2	1,23E-02	-1,15
226594	RCSD domain containing 1	Rcsd1	3,92E-03	-1,14
20610	Small ubiquitin-like modifier 3	Sumo3	8,65E-03	-1,14



#### 4.5.4 Vergleichende funktionelle Analyse von microRNA- und Proteomdaten

IPA®'s microRNA Target Filter wurde ebenfalls verwendet, um potentielle Zieltranskripte (*Targets*) anhand der Proteomdaten zu identifizieren, da sich der inhibierende Effekt von microRNAs nicht nur im Abbau von mRNA *Targets* durch komplementäre microRNA-mRNA-Paarung, sondern auch in der Translationshemmung bei der Proteinbiosynthese widerspiegeln sollte. Dazu wurden Proteom- und microRNA-Datensätze kombiniert und wie im vorherigen Kapitel inverse Expressionspaarungen ermittelt und nach herzspezifischen, CVD assoziierten *Targets* priorisiert und gefiltert (Tab. 4.8).

Von den 43 in TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub> veränderten microRNAs wurden unter Verwendung eben erwähnter *Workflow*-Spezifikationen 28 microRNAs identifiziert, die mit insgesamt 168 bzw. 55 signifikant veränderten ( $p < 0,05$ ), herzrelevanten *Targets* inverse Expressionspaarungen aufwiesen. Von den 62 in TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub> veränderten microRNAs wurden 39 identifiziert, mit insgesamt 185 bzw. 53 ( $p < 0,05$ ) inversen *Targets* basierend auf den Proteomdaten (Tab. 4.13).

**Tabelle 4.13: Anzahl identifizierter mRNA-Targets anhand der Proteomdaten aus IPA®'s microRNA Target Filter Analyse.** Die Tabelle listet die Anzahl inverser microRNA-mRNA-Expressionspaarungen unter Verwendung der Proteomdaten und Berücksichtigung der angewendeten Einstellungen des microRNA Target Filter *Workflows* auf.

Gruppenvergleich	microRNAs (Upload, $q < 0,05$ )	microRNAs nach Priorisierung und Filtern	mRNA-Targets	
			ohne <i>Cutoff</i>	$p < 0,05$
TAC <sub>/LM</sub> vs. Sham <sub>/LM</sub>	43	28	168	55
TAC <sub>/RIO</sub> vs. Sham <sub>/RIO</sub>	62	39	185	53

Eine vollständige Auflistung dieser microRNAs und deren *Targets* basierend auf den Proteomdaten, zusammen mit den entsprechenden Expressionsänderungen und Expressionspaarungen ist dem **Anhang S8** zu entnehmen.

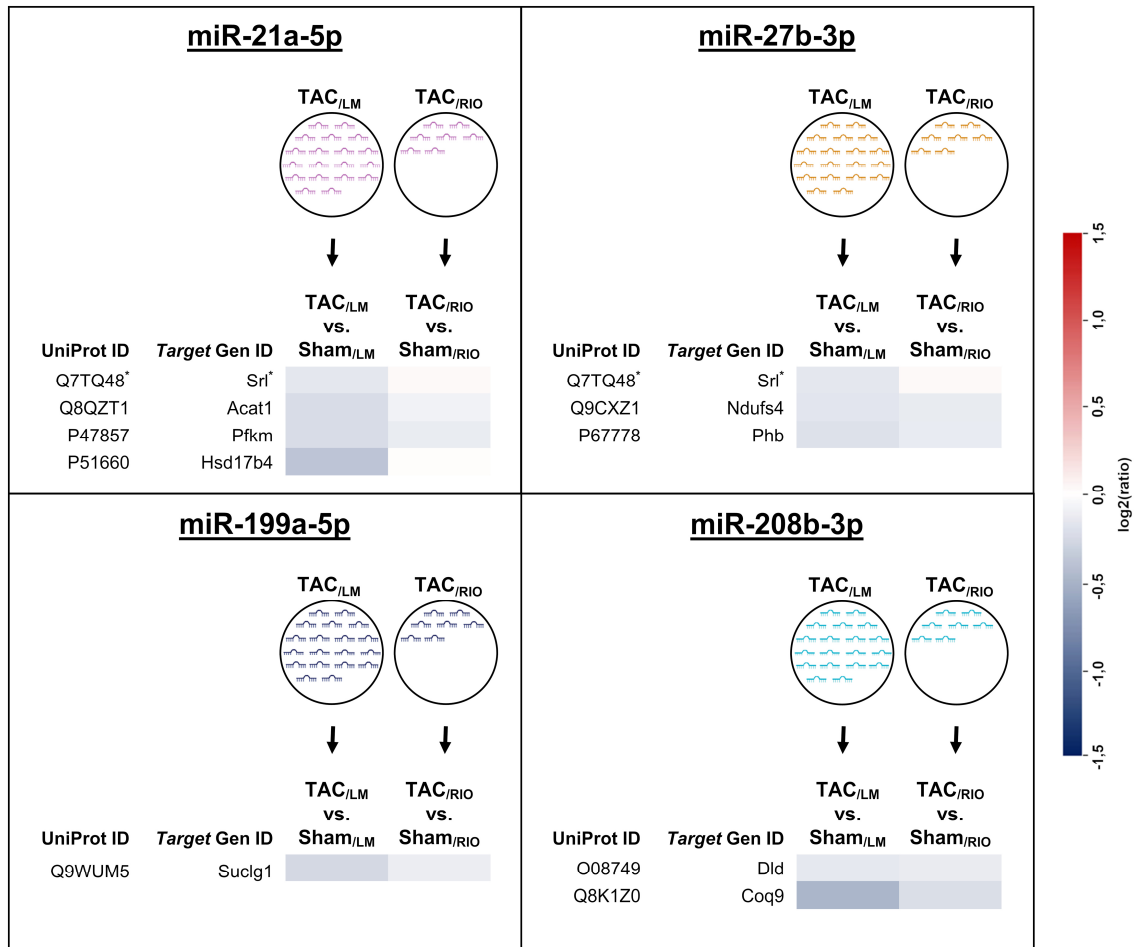
Im Weiteren wurden negativ korrelierte microRNA-*Target*-Interaktionen näher betrachtet. Die Tabelle 4.14 zeigt alle identifizierten inversen Expressionspaarungen von hochregulierten microRNAs nach TAC und entsprechend herunterregulierten *Targets*, die in signifikanten Veränderungen auf Proteinebene sichtbar waren (TAC<sub>/LM</sub> vs. Sham<sub>/LM</sub>). Gleichzeitig sind die Auswirkungen einer RIO-Medikation im indirekten Vergleich (TAC<sub>/RIO</sub> vs. Sham<sub>/RIO</sub>) sowohl auf microRNA- als auch auf *Target*-Ebene dem gegenübergestellt.

**Tabelle 4.14: Negativ korrelierte microRNA-Target-Interaktionen basierend auf den Proteomdaten.** Die Tabelle listet alle microRNAs mit signifikant erhöhten Expressionen nach TAC ( $q < 0,05$ ) auf, die verringerte Expressionen nach RIO-Medikation zeigten. Dem gegenübergestellt sind entsprechend inverse *Target*-Expressionsparungen basierend auf den Proteomdaten, die ebenfalls abgeschwächte Abundanzänderungen auf Proteinebene nach RIO zeigten. Signifikante Veränderungen sind fettgedruckt hervorgehoben. (miR: reife und funktionsfähige – „mature“ – microRNAs)

microRNA Informationen				Target Informationen basierend auf den Proteomdaten				
miR	MIMAT ID	Fold Change		Gen ID	UniProt ID	Proteinbeschreibung	Fold Change	
		TAC <sub>/LM</sub> vs. Sham <sub>/LM</sub>	TAC <sub>/RIO</sub> vs. Sham <sub>/RIO</sub>				TAC <sub>/LM</sub> vs. Sham <sub>/LM</sub>	TAC <sub>/RIO</sub> vs. Sham <sub>/RIO</sub>
mmu-miR-21a-5p	MIMAT0000530	<b>1,50</b>	1,21	Acat1	Q8QZT1	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	<b>-1,17</b>	<b>-1,06</b>
				Hsd17b4	P51660	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	<b>-1,31</b>	1,01
				Pfkm	P47857	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type	<b>-1,17</b>	<b>-1,09</b>
				Srl	Q7TQ48	Sarcalumenin	<b>-1,11</b>	1,03
mmu-miR-27b-3p	MIMAT0000126	<b>1,47</b>	<b>1,23</b>	Ndufs4	Q9CXZ1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial	<b>-1,12</b>	<b>-1,10</b>
				Phb	P67778	Prohibitin	<b>-1,15</b>	-1,10
				Srl	Q7TQ48	Sarcalumenin	<b>-1,11</b>	1,03
mmu-miR-199a-5p	MIMAT0000229	<b>1,95</b>	<b>1,73</b>	Suclg1	Q9WUM5	Succinyl-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial	<b>-1,20</b>	<b>-1,08</b>
mmu-miR-208b-3p	MIMAT0004939	<b>9,15</b>	<b>6,49</b>	Coq9	Q8K1Z0	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial	<b>-1,40</b>	<b>-1,17</b>
				Dld	O08749	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	<b>-1,11</b>	<b>-1,09</b>
mmu-miR-212-3p	MIMAT0000659	<b>1,57</b>	1,34	Acadm	P45952	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	<b>-1,31</b>	<b>-1,18</b>
				Sod2	P09671	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	<b>-1,27</b>	-1,09
				Sucla2	Q9Z219	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	<b>-1,28</b>	<b>-1,19</b>
mmu-miR-214-3p	MIMAT0000661	<b>1,81</b>	<b>1,58</b>	Acat1	Q8QZT1	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	<b>-1,17</b>	<b>-1,06</b>
				D10Jhu81e	Q9D172	ES1 protein homolog, mitochondrial	<b>-1,20</b>	<b>-1,19</b>
				Phb	P67778	Prohibitin	<b>-1,15</b>	-1,10
mmu-miR-214-5p	MIMAT0004664	<b>1,81</b>	<b>1,65</b>	Phpt1	Q9DAK9	14 kDa phosphohistidine phosphatase	<b>-1,27</b>	-1,10
mmu-miR-215-5p	MIMAT0000904	<b>1,46</b>	-1,05	Adipoq	Q60994	Adiponectin	<b>-1,30</b>	<b>-1,12</b>
				Akr1b1	P45376	Aldose reductase	<b>-1,19</b>	-1,07
				Got1	P05201	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	<b>-1,21</b>	<b>-1,14</b>
				Hibadh	Q99L13	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	<b>-1,46</b>	-1,16
mmu-miR-222-3p	MIMAT0000670	<b>1,49</b>	1,37	Acadl	P51174	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	<b>-1,13</b>	-1,05
				Acadm	P45952	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	<b>-1,31</b>	<b>-1,18</b>
				Sod2	P09671	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	<b>-1,27</b>	-1,09
mmu-miR-335-3p	MIMAT0004704	<b>1,41</b>	1,15	Fh	P97807	Fumarate hydratase, mitochondrial	<b>-1,14</b>	<b>-1,09</b>
mmu-miR-497a-5p	MIMAT0003453	<b>1,65</b>	<b>1,54</b>	Aifm1	Q9Z0X1	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	<b>-1,26</b>	<b>-1,14</b>
				Ivd	Q9JH15	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	<b>-1,40</b>	<b>-1,15</b>

Der Fokus lag hierbei auf revertierenden Effekten von RIO auf die microRNA-Expression nach TAC, was sich gleichzeitig in einer Abschwächung der Veränderungen auf Proteinebene widerspiegelte. Dadurch ließe sich eine microRNA assoziierte Regulation entsprechender Zieltranskripte vermuten, die in der Proteinbiosynthese anhand der Proteomdaten sichtbar war. Insgesamt wurden dabei 11 microRNAs identifiziert, für die ein inhibitorischer Effekt nach TAC für 22 *Targets* mit verringerter Proteinabundanz postuliert werden kann. Sowohl entsprechende microRNAs als auch Proteine zeigten eine – wenn auch meist nur sehr geringe – Abschwächung in ihrer Regulation nach RIO-Behandlung (Tab. 4.14).

In Abbildung 4.37 sollen diese Zusammenhänge noch einmal visualisiert werden. So wird eine Inhibition von Proteinen, die in die Energieproduktion und den Energiemetabolismus involviert sind, durch „miR-21a-5p“, „miR-27b-3p“, „miR-199a-5p“ und „miR-208b-3p“, die nach TAC hochreguliert waren, postuliert. Diese microRNAs zeigten eine niedrigere Expression nach einer RIO-Behandlung in TAC-Tieren und damit eventuell in Zusammenhang stehende erhöhte Level der entsprechenden microRNA *Targets*.



\* Target von verschiedenen microRNAs

**Abb. 4.37: Negativ korrelierte microRNA-Target-Interaktionen basierend auf den Proteomdaten.** Dargestellt sind nach TAC signifikant hochregulierte microRNAs ( $q < 0,05$ ), die eine Abschwächung der Expression nach einer RIO-Behandlung zeigten (exemplarisch die ersten vier aus Tab. 4.13), zusammen mit ihren potentiellen mRNA-Interaktionspartnern aus IPA®'s microRNA Target Filter Analyse basierend auf den Proteomdaten. Die Zuordnung von CVD assoziierten und herzwegebespezifischen Targets ist als negative Korrelation zwischen hochregulierten microRNAs und herunterregulierten Proteinen nach TAC dargestellt. Abgeschwächte microRNA-Expressionen aufgrund von RIO spiegeln sich in einer gleichzeitigen Abschwächung der Abundanzveränderungen auf Proteinebene wider.

## 5. Diskussion

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind noch immer die Haupttodesursache in der westlichen Welt, wobei die Herzinsuffizienz (HI) in den letzten Jahrzehnten die am schnellsten zunehmende Unterkategorie darstellt (Statistisches Bundesamt, 30. November 2020). Die HI ist ein sehr komplexes und heterogenes klinisches Syndrom, das auf kardiale Überbelastung und Schädigung zurückzuführen ist, und zu erheblicher Morbidität und Mortalität führt [7]. Typischerweise wird sie durch eine Reihe bekannter Erkrankungen ausgelöst, wie z.B. durch langjährigen Bluthochdruck, koronare Herzkrankheit, Myokardinfarkt, Ischämie, Myokarditis aufgrund eines infektiösen Erregers, hypertrophe und dilatative Kardiomyopathien oder Herzklappeninsuffizienz und -stenose [167]. Diese Stimuli führen anfangs meist zu einer kardialen Hypertrophie als adaptive Antwort, um die ventrikuläre Wandspannung zu reduzieren und die Herzfunktion als Reaktion auf eine erhöhte Arbeitslast aufrechtzuerhalten, ehe es zur Ausprägung eines pathologischen Phänotyps kommt [168]. Die Hausmaus *Mus musculus* stellt einen geeigneten Modellorganismus dar, um einerseits Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems bezüglich Entwicklung und Verlauf zu untersuchen [119, 169], andererseits aber auch um neuartige medikamentöse Interventionstherapien zu erforschen [170]. Der Stickstoffmonoxid (NO) – lösliche Guanylatzyklase (sGC) – cyclische Guanosinmonophosphat (cGMP) – Signalweg stellt einen Schlüsselregulator für die kardiovaskuläre Funktion dar. Dessen Beeinträchtigung führt im Herzen zu vaskulärer Dysfunktion und pathologischen Veränderungen wie Hypertrophie und Fibrose [75]. Eine Wiederherstellung des gestörten NO-sGC-cGMP-Signalweges scheint für die Behandlung der HI von besonderer Bedeutung zu sein, da dieser Signalweg ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Steuerung verschiedener physiologischer Prozesse, wie der kardiovaskulären Homöostase, des Zellwachstums und der Kontraktilität, einnimmt [39, 41]. Es wird bereits seit geraumer Zeit vermutet, dass sich eine Stimulation der sGC positiv bei der HI auswirken könnte, indem sie die Entwicklung und das Fortschreiten bzw. die Progression von Hypertrophie und Fibrose verhindert und/oder sogar umkehrt [171, 172]. Nach dem aktuellen Kenntnisstand wurden bisher nur wenige spezifische tierexperimentelle HI-Studien durchgeführt, die tiefere Einblicke in die molekularen Veränderungen und die anhaltenden kardioprotektiven Effekte nach einer Riociguat-Medikation (RIO) geben [70, 173, 174]. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss einer sGC-Stimulation mittels RIO auf die experimentelle HI auf funktioneller und histologischer Ebene untersucht werden, mit anschließender Analyse der myokardialen, linksventrikulären Veränderungen auf Genexpressionsebene, Proteinebene und microRNA-Expressionsebene. Als Modell wurde die

transverse Aortenkonstriktion (TAC) an C57BL/6N Mäusen verwendet, welche einen permanenten hämodynamischen Stressreiz auf das Herz ausübt, der schließlich zum Herzversagen führt. Im Hinblick auf die Pathogenese der HI simuliert TAC dabei auf elegante Weise eine arterielle Hypertonie, die unter anderem zu einer progressiven linksventrikulären Hypertrophie und einer reduzierten Herzfunktion unter chronischen Bedingungen führt [175]. Für die medikamentöse Behandlung mit RIO wurde eine experimentelle Strategie gewählt, die mit der klinischen Realität übereinstimmt. Dementsprechend wurde mit der Medikation nicht vor der TAC-Ligatur begonnen, sondern zu einem Zeitpunkt, als die Herzfunktion bereits verschlechtert war und eine pathologische Hypertrophie und interstitielle Fibrose ausgebildet bzw. nachweisbar war [119]. Dies entspricht der klinischen Situation eines Patienten, der wegen einer HI medikamentös behandelt werden muss.

## **5.1 Auswirkungen einer Riociguat-Behandlung auf die Herzfunktion und pathologisches kardiales Remodeling nach TAC**

Das Herz reagiert auf pathologische Stimuli wie mechanischen Stress, Druckbelastung oder abnorme neurohumorale Aktivierung mit Hypertrophie und Remodeling. Dabei zeigen sich mikro- und makrostrukturelle Umgestaltungsprozesse unter anderem in der Zunahme der Kardiomyozytengröße, interstitieller Fibrose, Apoptose und der Reinduktion des fetalen Genexpressionsprogramms. Diese Regulationsmechanismen sind zunächst kompensatorisch und dienen der Aufrechterhaltung der kardialen Funktion und Leistung, führen auf Dauer aber zur Herzinsuffizienz [167, 176]. Das gewählte *in vivo* Modell der Nachlasterhöhung durch TAC zur Induktion einer chronischen HI bietet den Vorteil, dass die Progression der Erkrankung in Anwesenheit aller Organe und des Blutkreislaufes betrachtet werden kann und weitere Einflüsse wie Immunreaktionen und neurohumorale Faktoren nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren können alle Stadien vom gesunden Tier, über kompensatorische Phasen bis hin zum insuffizienten und dekompensierten Phänotyp in einem kurzen Beobachtungszeitraum untersucht werden [119, 175]. Für die Diagnostik kardialer Funktionsstörungen gilt die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) als Standard im klinischen Alltag. Dieser Parameter gibt den prozentualen Anteil des Blutvolumens aus dem linken Ventrikel (LV) an, der während der systolischen Kontraktionsphase ausgeworfen wird. Im klassischen Sinne wird eine HI im Patienten mit einer LVEF von weniger als 40% definiert. In den letzten Jahren erfolgte allerdings eine Neueinteilung, nach den aktuellen und vor kurzem erst veröffentlichten Guidelines in 3 Subgruppen: i) HI mit erhaltener LVEF  $\geq 50\%$  (HFpEF, *heart failure*

with preserved ejection fraction), ii) HI mit leichtgradig eingeschränkter LVEF zwischen 41-49% (HFmrEF, *heart failure with mildly reduced ejection fraction*), und iii) HI mit reduzierter LVEF  $\leq 40\%$  (HFrEF, *heart failure with reduced ejection fraction*) [177, 178]. Auch wenn es für Versuchstiere, und die Maus im Speziellen, hierfür keine Standarddefinition gibt, gilt eine LVEF  $\geq 50\%$  als normal und eine LVEF  $\leq 30\%$  als stark eingeschränkt [175, 179-181].

Im Rahmen des hier durchgeführten Tierversuchs wurde die Herzfunktion der Mäuse nach TAC- bzw. Sham-OP wöchentlich mittels Kleintierechokardiographie evaluiert, um den progredienten HI-Verlauf sowie die Auswirkung einer RIO-Medikation engmaschig zu überwachen und abzubilden (Abb. 4.2, Tab. 4.1). Es konnte gezeigt werden, dass die Pumpfunktion nach TAC eine relativ gleichmäßige und progressive Verschlechterung über die Zeit aufwies. Diese durch eine Abnahme der LVEF dokumentierte Einschränkung der Pumpfunktion wurde sowohl von einer Massenzunahme des linken Ventrikels im Verhältnis zum Körpergewicht (LVM/BW) als auch der Verringerung der linksventrikulären Verkürzungsfraktion (LVFS, *left ventricular fractional shortening*) begleitet. Aus einer früheren Studie war bekannt, dass der gewählte Zeitraum von insgesamt 8 Wochen ideal dafür geeignet ist, den Verlauf der Herzfunktion nach TAC über die Entwicklung einer subklinischen HI mit beginnender systolischer Dysfunktion bis zur Ausbildung einer HI im Endstadium zu untersuchen [119]. Dabei kommt es nach einer initialen Einschränkung der Herzfunktion zu einer Phase von Kompensationsprozessen, in der es dem Herzen noch möglich ist, der erhöhten Arbeitslast in gewissem Maße und über einen gewissen Zeitraum entgegenzuwirken, bis der Verlauf der Erkrankung in eine finale Dekompensation mündet. Obwohl diese erwartete kompensatorische Plateauphase diesmal nicht beobachtet werden konnte, wiesen die Mäuse zum Ende des Versuchszeitraums an Tag 56 pathologische Veränderungen des Herzens und starke kardiale Funktionseinschränkungen auf. Neuere Studien weisen darauf hin, dass die Stärke der Ligatur einen nicht zu vernachlässigen Einfluss auf die Ausprägung des pathologischen Phänotyps nach TAC hat [182, 183]. Die für die vorliegende Studie verwendete Konstriktion des Aortenbogens auf 26G wird laut Richards et al. als eine moderate Verengung definiert, die zu signifikanter linksventrikulärer Hypertrophie und milder kardialer Dysfunktion und Fibrose nach 4 Wochen führt, wohingegen eine stärkere Ligatur auf 27G sowohl eine schwerere Dysfunktion als auch stärkere kardiale Fibrosierung auslöst und damit eher die Merkmale einer HI aufweist [183]. Die naheliegende Frage, ob 27G TAC daher eventuell geeigneter gewesen wäre, um den Krankheitsverlauf abzubilden, lässt sich jedoch verneinen. Unter Berücksichtigung des längeren Versuchszeitraumes, um ebenfalls Aussagen über einen Langzeiteffekt einer Medikation mit RIO zu erhalten, erscheint die mildere Aortenkonstriktion auf 26G und ein moderater, nicht so rapide verlaufender Krankheitsverlauf als besser geeignet, da

mit verstärktem Schweregrad der Erkrankung ebenfalls eine erhöhte Mortalität der Versuchstiere über einen längeren Versuchszeitraum einhergeht.

Eine Medikation mit RIO verhinderte die Verschlechterung der LV Funktionsparameter nach TAC und verbesserte die systolische Herzfunktion (Abb. 4.2, Tab. 4.1). Bereits eine Woche nach Beginn der Medikation an Tag 21 post-OP war die LVEF in behandelten TAC-Tieren signifikant verbessert im Vergleich zu unbehandelten. Auch wenn sich die Herzfunktion im Verlauf der 5 Behandlungswochen bis zum Versuchsende immer weiter verbesserte, so erreichte sie jedoch nicht wieder das Ausgangsniveau gesunder Sham-Tiere. Dies lässt vermuten, dass eine RIO-Behandlung sowohl eine präventive als auch reparative Wirkung aufweist, erkennbar ebenfalls an der Abnahme des LVESV als wichtigem Parameter für reverses Remodeling (Abb. 7.1, Tab. 7.1). Eine Behandlung milderte auch pathologisches kardiales Remodeling wie Fibrose (Abb. 4.4) und Hypertrophie (Abb. 4.3) ab. Eine linksventrikuläre Drucküberlastung ist mit einer erhöhten Kollageneinlagerung verbunden, die zu Fibrosierung und in der Folge zu einer erhöhten Wandsteifigkeit und Beeinträchtigung der Herzfunktion führen kann [184]. Die beobachteten anti-fibrotischen Effekte in Folge einer RIO-Behandlung stehen im Einklang mit Befunden zur sGC-Stimulation in verschiedenen anderen Modellen der Hypertrophie und Herzinsuffizienz [68, 69, 172, 173, 185]. So verbesserte RIO in Rattenmodellen der Hypertonie und der chronischen kardialen Volumenüberlastung die systolische Herzfunktion sowie die Überlebensrate und reduzierte Hypertonie und kardiale Fibrose [68, 69]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass RIO das LV Remodeling nach Myokardinfarkt im Mausmodell abschwächt [70], die Funktion des Spenderorgans nach einer Herztransplantation bei Ratten verbessert [186], und positive Effekte auf LVFS und interstitielle Fibrose nach TAC zeigt [173]. In Ergänzung zu den eben erwähnten früheren Studien, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass RIO sowohl LVFS und LVEF verbesserte und nicht nur die Fibrose, sondern auch die TAC-induzierte LV Hypertrophie *in vivo* reduzierte. Ähnliche Effekte auf Kardiomyozyten auf zellulärer Ebene wurden bereits in einer früheren Studie unter Verwendung anderer sGC-Aktivatoren und -Stimulatoren beobachtet. Eine *in vitro* Studie an neonatalen Rattenkardiomyozyten zeigte, dass sowohl die Stimulation als auch die Aktivierung der sGC eine Endothelin-1 induzierte hypertrophe Antwort in Abwesenheit von hämodynamischen Störfaktoren verringert, was wiederum einen direkten Effekt auf das Ausmaß des versagenden Herzen vermuten lässt [187].

Um kardiovaskuläre Begleiterscheinungen einer RIO-Medikation zu erkennen, wurden ebenfalls die Herzfrequenz aufgezeichnet sowie die Flussgeschwindigkeit am Aortenbogen bei jeder Messung bestätigt (Abb. 4.1, 4.2, Tab. 4.1). Da die Funktionsuntersuchungen mittels Kleintierechokardio-



graphie unter Narkose durchgeführt wurden, war es hierbei wichtig, die Herzfrequenz zwischen  $> 400$  und  $< 650$  Schlägen pro Minute zu halten, um die physiologische Relevanz und Aussagekraft der erhobenen Parameter zu gewährleisten [179]. Allerdings stand kein invasives hämodynamisches Monitoring zur Verfügung, um Änderungen des Blutdrucks bei den Tieren zu messen. Aufgrund der vasodilatatorischen Wirkweise von RIO kann die fehlende Aufzeichnung des Blutdrucks als Limitation bewertet werden. Auch wenn die Drucküberlastung durch TAC immer konstant war, und damit auch die Nachlasterhöhung der linken Ventrikel, kann argumentiert werden, dass periphere vaskuläre Effekte teilweise zu den positiven Effekten von RIO im verwendeten HI-Modell beigetragen haben könnten. Interessanterweise deuten jedoch mehrere *in vitro* und *in vivo* Studien ebenfalls darauf hin, dass die beobachteten positiven Effekte einer sGC-Stimulation durchaus unabhängig von hämodynamischen Veränderungen sind, wie vor kurzem erst ausführlich gereviewt [75, 188].

## 5.2 Auswirkungen einer Riociguat-Behandlung auf linksventrikuläre molekulare Veränderungen nach TAC

Bei der HI trägt eine Vielzahl verschiedener zellulärer Mechanismen zum Phänotyp mit verringertem ventrikulären Kontraktionsvermögen und Ventrikeldilatation bei. Auch ist bisher nicht genau bekannt, inwieweit eine Behandlung mit RIO einen direkten Einfluss auf das myokardiale Gewebe hat. Mittels Multi-Omics-Ansätzen wie *Proteomics* und *Transcriptomics* sollten in dieser Arbeit daher detaillierte globale Einblicke in die molekularen Veränderungen erlangt werden, denen das murine Herz nach TAC bei der Ausbildung einer HI unterliegt und welche Effekte eine RIO-Behandlung darauf und auf die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zeigte. Die RNA-Seq-Technologie hat sich hierbei als attraktive Alternative zu den traditionellen Microarray-Plattformen für die Durchführung von Transkriptomanalysen entwickelt [189-191]. Die Transkriptmengen spiegeln jedoch nicht zwangsläufig die Abundanzen der entsprechend translatierten Proteine wieder, da mRNA einer Vielzahl von post-transkriptionalen Modifikationen unterliegt [192, 193]. Da im biologischen System die Proteine letztendlich die Effektoren bzw. Akteure darstellen, sollten ebenfalls massenspektrometrische Proteomanalysen zum Verständnis der molekularen Prozesse bei der TAC-induzierten HI und den Auswirkungen einer sGC-Stimulation mittels RIO beitragen. Der Fokus lag hierbei im Speziellen auf den Analysen der linken Ventrikel. Schon allein aufgrund der größeren Arbeitslast des zu versorgenden Körperkreislaufes ist der linke Ventrikel stärker ausgebildet und unterliegt verstärkt morphologischen Veränderungen durch externe Stimuli [168, 194].

Die Analysen ergaben, dass eine sGC-Stimulation mittels RIO auch mit Änderungen auf molekularer Ebene in den LV nach TAC verbunden ist. Bereits in den Hauptkomponentenanalysen zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen TAC und Sham, aber insbesondere Unterschiede zwischen TAC-Tieren mit und ohne Medikation sowohl im Transkriptom (Abb. 4.5) als auch im Proteom (Abb. 4.16). So waren die beobachteten positiven Effekte der sGC-Stimulation auch auf molekularer Ebene mit für die kardiale Funktion vorteilhaften Veränderungen der Genexpression verbunden. Im Allgemeinen waren weniger Gene in TAC-Herzen differentiell reguliert, wenn die Tiere mit RIO behandelt wurden, was darauf hinweist, dass eine Behandlung zu einer verminderten Stressreaktion führte (Abb. 4.6, 4.7, 4.8). Auch wurden weniger TAC-induzierte Veränderungen nach einer RIO-Behandlung im Proteom beobachtet, was diese Schlussfolgerung auch auf Proteinebene weiter stützt (Abb. 4.17, 4.18). Insbesondere waren dabei zytoskelettale und Zellstruktur-assoziierte Signalwege beeinflusst, was auf einen positiven Einfluss der sGC-Stimulation bei der Wiederherstellung der LV Funktion hindeutet. Außerdem zeigten vor allem kardiale Fibrose und Fibrose-assoziiertes *Signaling* anhand der Transkriptomdaten eine Veränderung. Diese Signalwege wiesen nach TAC eine Anreicherung regulierter Transkripte und eine Aktivierung auf, während sie nach RIO-Medikation nicht mehr aktiviert waren, bzw. deutlich weniger regulierte Transkripte zugeordnet wurden (Abb. 4.9, 4.10). Ein ähnliches Bild zeigte sich ebenfalls im Proteom (Abb. 4.20, Abb. 4.24, Tab. 4.6). Dies deckt sich mit den histologischen Ergebnissen zur Messung der fibrotischen Areale, wie bereits in Abschnitt 5.1 diskutiert. Wie zuvor erwähnt, ist die kardiale Fibrose ein Kennzeichen für maladaptives Remodeling nach TAC, welches die myokardiale Steifigkeit erhöht und in Folge die Herzfunktion beeinträchtigt, da es zu einer massiven Zunahme von Kollageneinlagerungen kommt [184, 195]. Eine entscheidende Rolle spielen hierbei Fibroblasten. Sie sind für die Synthese der extrazellulären Matrix (ECM) im Herzmuskel verantwortlich und spielen eine wichtige Rolle für die strukturelle, mechanische und elektrische kardiale Funktion [196]. Den Hauptbestandteil an Strukturproteinen der ECM stellen hierbei Kollagene dar, wobei die fibrillären Kollagene des Typs I und III über 90% des totalen Kollagengehaltes im Herzen ausmachen. Während sich Typ I zu dicken Fasern zusammenlagert und dadurch sehr belastbare strukturelle Unterstützung bereitstellt, so formiert Typ III hingegen ein feines Netzwerk aus Fibrillen, die vor allem die Elastizität des Gewebes sicherstellen [197, 198]. Ein Schlüsselereignis bei der Entwicklung von kardialer Fibrose ist die Aktivierung der Fibroblasten durch pathologische Stimuli, wie Dehnungsreize, Hypoxie und Inflammation, was schließlich zu einem Phänotypwechsel und der Transformation zu Myofibroblasten führt, die wiederum für vermehrte Kollageneinlagerung sorgen [199]. Einen bedeutenden Regulator stellt hierbei der *Transforming growth factor  $\beta$*  (TGF $\beta$ ) dar, der weithin als

der wohl wichtigste pro-fibrotische Wachstumsfaktor gilt und sowohl die vermehrte Kollageneinlagerung als auch die Fibroblastenproliferation und Differenzierung zu Myofibroblasten induziert bzw. stimuliert [200, 201]. Die differenzierten Myofibroblasten sezernieren zusätzlich vermehrt TGF $\beta$  und weitere Wachstumsfaktoren und Zytokine, was zu einer *feed-forward* Schleife führt. Dadurch entstehen noch mehr Myofibroblasten, die proliferieren und vermehrt ECM-Bestandteile einlagern, was schließlich in pathologischen Veränderungen in der Gewebearchitektur und Organdysfunktion mündet [201, 202]. In den Transkriptomdaten der vorliegenden Arbeit konnten sowohl Untereinheiten des Kollagentyps I (*Col1a1*, *Col1a2*) und III (*Col3a1*) identifiziert werden, die nach TAC hoch- und durch RIO wieder herunterreguliert waren (Abb. 4.14, Tab. 4.6, S1, S2), wovon die Untereinheit COL1A2 auch im Proteom bestätigt werden konnte (Abb. 4.25, Tab. 4.6, S3, S4-II). Von TGF $\beta$  existieren insgesamt drei verschiedene Isoformen (*Tgfb1*, *Tgfb2*, *Tgfb3*), die auch alle in den Transkriptomdaten (S1) identifiziert und unter anderem den IPA®-Kategorien *Fibrosis Signaling* und *Cardiac Hypertrophy Signaling* zugeordnet wurden (Abb. 4.9). Auch wenn deren Expression nicht sehr stark war, so waren alle drei Isoformen nichtsdestotrotz signifikant aufgrund von TAC erhöht und wiederum nach RIO abgeschwächt bzw. im Trend vermindert exprimiert. Trotz vieler *in vitro* und *in vivo* Studien zu verschiedensten fibrotischen Erkrankungen ist der genaue Mechanismus der TGF $\beta$ -vermittelten Aktivierung der Fibrose und die anti-fibrotische Rolle des sGC-cGMP-Signalweges bei der Behandlung noch immer nicht vollständig charakterisiert [203]. Jedoch scheint der NO-sGC-cGMP Signalweg eine wichtige Rolle zu spielen. So inhibiert eine cGMP-Erhöhung die TGF $\beta$ -induzierte ECM-Produktion, Myofibroblastendifferenzierung und Zellproliferation, wie mehrere Studien *in vitro* und *in vivo* in verschiedenen Fibrosemodellen übereinstimmend zeigen konnten [72, 74, 171, 172, 204-207]. Somit könnten die anti-fibrotischen Effekte einer sGC-Stimulation mittels RIO nach TAC auch im Herzen auf einer reduzierten Fibroblastenproliferation, zusammen mit einer verringerten Sekretion von Kollagenen, sowie auf einem verminderten Phänotypwechsel zu Myofibroblasten im Zusammenhang mit einer Verringerung von TGF $\beta$  beruhen. Auch konnte gezeigt werden, dass die Redifferenzierung von Myofibroblasten zurück zu Fibroblasten durch einen Anstieg von cGMP verstärkt wird, was ebenfalls zu den anti-fibrotischen Effekten einer RIO-Behandlung beitragen könnte [208]. Weitere Effekte könnten auf die Auswirkungen einer sGC-Stimulation auf Endothelzellen zurückzuführen sein, den Prozess der Endothelial-mesenchymalen Transition (EndMT). EndMT beschreibt den Prozess der Differenzierung von Endothelzellen zu Fibroblasten. In einem Mausmodell der Drucküberlastung konnten Zeisberg et al. zeigen, dass eine Aortenkonstriktion die EndMT induziert und diese wahrscheinlich durch TGF $\beta$ 1 vermittelt wird, da ebenfalls in deren *in vitro* Analysen an humanen koronaren Endothelzellen eine EndMT durch

TGF $\beta$ 1-Stimulation induziert und durch TGF $\beta$ 1-Inhibition wieder blockiert werden konnte [209]. Da eine cGMP-Erhöhung auch im Zusammenhang mit verminderter TGF $\beta$ 1-Expression in murinen Modellen der linksventrikulären Nachlastserhöhung steht [172], könnte die Verringerung von EndMT ebenfalls einen Mechanismus der anti-fibrotischen Effekte von RIO darstellen. Auch konnte gezeigt werden, dass eine sGC-Stimulation anti-entzündliche Effekte durch die Inhibition der Leukozytenrekrutierung aufweist [210]. Entzündung ist ebenfalls mit kardialer Fibrose assoziiert [211]. In einem Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass eine Drucküberlastung durch Aortenkonstriktion zu Makrophagenakkumulation und Fibroblastenproliferation im LV führte und eine Blockierung dieser Makrophageninvasion die Fibroblastenproliferation inhibierte [212]. Daher könnte dies eine weitere Möglichkeit darstellen, wie RIO anti-fibrotische Effekte hervorruft.

Auch die TAC-induzierte Aktivierung weiterer stressrelevanter Signalwege wurde durch eine RIO-Behandlung reduziert bzw. abgeschwächt, was ebenfalls darauf hindeutet, dass RIO die HI-assoziierte Genexpression hemmt und somit pathologisches Remodeling stoppt (Abb. 4.9). So zeigten sich im Transkriptom vor allem CVD-assoziierte Signalwege wie *Cardiac Enlargement*, *Damage*, *Necrosis/Cell Death* und *Dysfunction* als deutlich weniger stark betroffen nach einer Behandlung in TAC-Tieren (Abb. 4.11, 4.12, 4.13). Eine RIO-Behandlung zeigte ebenfalls eine Abschwächung pathologischer kardialer Prozesse und kardialer Organschädigungen auf Proteinebene nach TAC, die sich auch teilweise in der Revertierung bzw. Abschwächung entsprechend assoziierter Proteinmuster darstellte (Abb. 4.24, 4.25). Somit unterstützen die Proteomdaten die kardioprotektiven Effekte dieser Behandlung unter HI-Bedingungen und stehen im Einklang mit Befunden zur sGC-Stimulation in verschiedenen anderen Modellen der kardialen Dysfunktion und HI-Progression [68, 172, 185]. RIO schwächte außerdem die Aktivierung des fetalen Genprogramms (z.B. *Ankrd1*, *Myh7*, *Nppa*, *Nppb*) in den LV von TAC-operierten Mäusen ab, was die Hypothese der reduzierten kardialen Stressantwort aufgrund der pharmakologischen Intervention weiter unterstützt (Abb. 4.14, Tab. 4.2). Nach dem Einsetzen von erhöhtem mechanischen Stress oder Drucküberlastung ist eine der ersten molekularen Veränderungen die Reaktivierung des fetalen Genprogramms, dem sogenannten fetalen „Genswitch“, bei dem eine Reihe von Genen aktiviert wird, die normalerweise nur im wachsenden, sich entwickelnden Herzen exprimiert werden und im adulten Myokard unterdrückt sind. Diese Aktivierung ermöglicht die koordinierte Synthese von Proteinen, die für die Hypertrophie der Myozyten und die Anpassung an den veränderten Energiebedarf dieser vergrößerten Zellen erforderlich sind [213]. Während es eine Vielzahl von re-exprimierten fetalen Genen während der Hypertrophie gibt, werden insbesondere die Expressionslevel der schweren Myosinketten (*myosin heavy chains*, MHC), der natriuretischen Peptide (NP) und des  $\alpha$ -Actinins als

molekulare Marker der Hypertrophie verwendet [214]. Vor allem Transkripte der bekannten HI-Marker ANP (atriales natriuretisches Peptid, *Nppa*) und BNP (natriuretisches Peptid Typ B, *Nppb*) wurden besonders stark reguliert. Einerseits war deren Expression durch TAC erhöht und andererseits durch RIO nach TAC wieder reduziert (Tab. 4.2, Abb. 4.14). Beide Marker werden für die Diagnose und Einschätzung des Schweregrades der HI genutzt, wobei sich N-terminales proBNP (NTproBNP) als Plasmabiomarker im klinischen Alltag durchgesetzt hat [215]. Aufgrund ihrer diuretischen, natriuretischen, vasorelaxatorischen und inhibitorischen Wirkung auf das Aldosteron- und Renin-System gelten NPs als Inhibitoren der Hypertrophie und es wird angenommen, dass deren Reexpression einen anti-hypertrophen Kompensationsmechanismus im Myokard darstellt [216]. So verursachte die Deletion von ANP in Mäusen z.B. erhöhten Blutdruck und Hypertrophie bereits unter Ruhebedingungen und führte unter Volumen- und Drucküberlastung zu einer stärkeren hypertrophen Antwort im Vergleich zu Wildtyp-Tieren [217, 218]. Des Weiteren wiesen ANP-defiziente Mäuse eine erhöhte Expression von ECM-Proteinen in Folge der Hypertrophie auf, was darauf hindeutet, dass ANP das hypertrophe Remodeling durch die Hemmung von ECM-Einlagerung reduzieren kann [218]. Im Gegensatz zu ANP führte eine BNP-Deletion nicht zu Hypertonie und Hypertrophie, sondern verursachte eine Zunahme von interstitieller Fibrose in den Ventrikeln, die sich nach Ventrikelüberlastung noch verstärkte [219]. Der NP-vermittelte anti-hypertrophe Effekt scheint dabei über die Produktion von cGMP zu verlaufen. NPs wirken durch die Bindung an die natriuretischen Peptidrezeptoren (NPRs), die auch als Guanylatzyklase-Rezeptoren (GCRs) bezeichnet werden. In Folge dessen kommt es zur Aktivierung der Guanylatzyklase und der damit verbundenen Umwandlung von GTP in cGMP [220]. Wenn nun ANP und BNP protektiv wirken, warum kommt es dann trotzdem zu Hypertrophie und Fibrose in Patienten, die hohe ANP- und BNP-Level aufweisen? Möglicherweise verlangsamen NPs das Fortschreiten von Hypertrophie und Fibrose nur eine Zeit lang, sind aber nicht in der Lage, diese Progression bei anhaltender Druck- oder Volumenüberlastung vollständig aufzuhalten. Interessanterweise vermuten Kuhn et al. in ihrer Studie zu LV Herzunterstützungssystemen (*left ventricular assist device*, LVAD), dass der NP-vermittelte protektive Effekt durch verringerte Reaktivität von NPR-A bei gleichzeitig erhöhten Leveln des NP-metabolisierenden NPR-C (*NP clearance receptor*) bei der chronischen HI verloren geht [221]. Eine Behandlung mit RIO würde diese NP-Inhibierung durch direkte Stimulation der sGC und der daraus resultierenden Erhöhung der cGMP-Level umgehen.

Im Proteom wurden als auffällige und bekannte HI-Marker Myosin-7 (MYH7), kardiales Phospholamban (PLN) und *Ankyrin repeat domain-containing protein 1* (ANKRD1) als die Zielproteine identifiziert, welche die stärksten TAC-induzierten Veränderungen aufwiesen und

gleichzeitig sehr stark durch eine RIO-Behandlung zurückreguliert waren (Abb. 4.19, 4.25, 4.26). Diese Regulation wurde auch auf Transkriptomebene deutlich (Tab. 4.2, 4.6). MYH7 und ANKRD1 repräsentierten hierbei die Proteine mit der stärksten Abundanzsteigerung aufgrund von TAC, respektive explizit vorhanden und TAC-induziert. Bei kleineren Säugetieren, wie z.B. Mäusen, ist die vorherrschende kardiale Myosin-Isoform während der Entwicklung Myosin-7 (MYH7) und wird im adulten Herzen später durch Myosin-6 (MYH6) ersetzt. Beim Menschen und anderen größeren Säugetieren ist es umgekehrt, MYH6 stellt während der Entwicklung und MYH7 im Erwachsenenalter die dominierende Isoform dar [222]. Im versagenden Herzen kann kardiales Myosin als Reaktion auf kardiovaskulären Stress zu seiner fetalen Isoform wechseln. Wie bereits zuvor erwähnt, wird vermutet, dass dieser fetale „Genswitch“, der durch Stresssignale während des kardialen Remodelings ausgelöst wird, für die Krankheitsprogression relevant ist [33]. Bei ANKRD1 handelt es sich ebenfalls um einen Marker des fetalen Genprogramms. Dieser spezifische Marker der kardialen Stressantwort ist im embryonalen Herzen hochgradig exprimiert, im adulten Herzen jedoch nur auf einem niedrigen Niveau. Es wirkt pleiotrop als Transkriptionsregulator, bei der Mechanosensorik und als Teil der Sarkomere, um deren strukturelle Integrität aufrechtzuerhalten [223]. Wie MYH7 zeigte auch ANKRD1 eine verringerte Abundanz in RIO-behandelten TAC-Mäusen, was auf eine Reversion des fetalen Genprogramms hindeutet und wiederum die Hypothese der vorteilhaften und kardioprotektiven Effekte einer sGC-Stimulation bei der HI unterstützt. Kardiales Phospholamban (PLN), ein reversibler Regulator der kardialen Kontraktilität, war das Protein mit der stärksten Reduktion der Abundanz nach TAC. Dephosphoryliertes PLN hemmt die sarkoplasmatische/endoplasmatische Retikulum (SR/ER)  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2a), während die Phosphorylierung von PLN diese Hemmung umkehrt, indem sie PLN selbst dadurch hemmt [224]. In einem *Pln-Knockout*-Mausmodell konnten u.a. signifikant erhöhte kontraktile Parameter bis hin zu einer Hyperkontraktilität gezeigt werden [225]. Des Weiteren kommt es in Folge des Fehlens von PLN zu zahlreichen Veränderungen im murinen LV Proteinmuster sowie dessen Phosphorylierungsstatus, die hauptsächlich strukturelle und energiemetabolische Proteine betreffen und damit auf die Aufrechterhaltung des physiologischen hyperdynamischen *Steady-State* (Dauerleistung, stabiler Zustand) der Kontraktilität hinweisen, wie eine andere Studie zeigen konnte [226]. Die reduzierten PLN-Level nach TAC könnten daher einen gewissen kompensatorischen Effekt widerspiegeln. Interessanterweise wurde auch eine erhöhte Phosphorylierung von PLN (p-PLN) in TAC-Mäusen beobachtet, wenn man p-PLN im Verhältnis zu Gesamt-PLN (p-PLN/PLN) betrachtet (Abb. 4.27). Dies impliziert, dass neben den verringerten PLN-Mengen nach TAC auch eine zusätzliche Hemmung durch Phosphorylierung des verbleibenden PLN auftrat. In

Übereinstimmung mit den bisher adressierten Ergebnissen, zeigten RIO-behandelte TAC-Mäuse eine weniger starke Reduktion von PLN und gleichzeitig eine ebenfalls weniger starke Phosphorylierung im Vergleich zu unbehandelten TAC-Tieren. Dies unterstreicht erneut die reversiblen Effekte der RIO-Behandlung, die beobachtet wurden. Da erhöhte PLN-Level und reduzierte p-PLN/PLN-Verhältnisse die positiven Effekte der RIO-Behandlung in TAC-Mäusen begleiteten, könnte demnach geschlussfolgert werden, dass dieser kompensatorische Mechanismus nach Verbesserung der Herzfunktion nicht mehr erforderlich war.

Die Entwicklung und das Fortschreiten einer HI, gleich welcher Ursache, ist mit einer progressiven und schrittweisen Verringerung der mitochondrialen Aktivität der Atmungskette bzw. des mitochondrialen Energiemetabolismus verbunden. Die daraus resultierende verminderte ATP-Produktion und Energieweiterleitung führt zu weiteren Fehlregulationen von zellulären Prozessen, die für die kardiale Pumpfunktion wesentlich sind, einschließlich des  $\text{Ca}^{2+}$ -Handlings und der kontraktile Funktion. Dies führt zu einer Abwärtsspirale aus erhöhtem Energiebedarf und verringerter Funktion [227]. Frühere Studien und auch die vorliegende Arbeit zeigten, dass der Energiestoffwechsel durch TAC im Besonderen betroffen ist [119]. Ein großer Teil der mitochondrialen Proteine, die sowohl an der Fettsäure- $\beta$ -Oxidation als auch an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind, wiesen reduzierte Abundanzen auf, was auf eine gestörte Energieversorgung im LV schließen lässt (Abb. 4.22). Mehrere Befunde von Patienten mit HI sowie Daten aus Tierstudien unterstreichen diese Ergebnisse, wie in einer aktuellen Übersichtsarbeit von Bertero und Maack zusammengefasst [228]. Eine Behandlung von TAC-Mäusen mit RIO führte zu einer deutlich geringeren Anzahl an veränderten mitochondrialen Proteinen, wodurch damit verbundene Stoffwechselwege, Funktionen und Prozesse weniger oder nicht mehr signifikant betroffen waren (Abb. 4.18, 4.20, 4.21). Dieser positive Einfluss einer Behandlung auf den kardialen Stoffwechsel unter HI-Bedingungen wird noch deutlicher, wenn man die einzelnen Komponenten der oxidativen Phosphorylierung und Fettsäureoxidation betrachtet (Abb. 4.22). Unter RIO-Behandlung waren die Level für viele Proteine wieder höher, auch wenn nicht die Abundanzen der Kontrolltiere erreicht wurden. Vorteilhafte Effekte von RIO auf den Energiemetabolismus waren ebenfalls im Transkriptom sichtbar, wenn auch eher nominal signifikant (Tab. 4.6).

Essentielle und zentrale Moleküle des NO-sGC-cGMP-Signalweges im kardiovaskulären System, wie die endotheliale NO-Synthase (eNOS = *Nos3*) und die lösliche Guanylatzyklase (sGC = *Gucy1a1/Gucy1b1*) waren überraschenderweise nur schwach oder nicht signifikant reguliert. Daher traten sie in den Hauptanalysen nicht so deutlich hervor, wie erwartet. Die nach TAC verringerten

Transkriptlevel der sGC bestätigen jedoch die Beeinträchtigung des NO-sGC-cGMP-Signalweges. Die nach TAC erhöhten Transkriptlevel der eNOS hingegen könnten einerseits auf einen Kompensationsmechanismus hindeuten, indem das Herz versucht, den verringerten Leveln der sGC nach TAC entgegenzuwirken, indem NO in höheren Konzentrationen produziert wird, um verstärkt die sGC zu aktivieren [229]. Andererseits führt TAC vermehrt zu oxidativem Stress [230], wodurch es zu verstärkter Dysfunktion der eNOS (*Uncoupling*) kommen kann [231]. Dies führt nicht nur zu einer verringerten Bioverfügbarkeit von NO, sondern auch zu einer gesteigerten Produktion radikaler Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) anstelle von NO durch die entkoppelte eNOS selbst [229]. Dieser gesteigerte oxidative Stress wiederum scheint zu verringerter sGC-Expression und Aktivität zu führen [232]. Die beobachteten Veränderungen von eNOS und der sGC in TAC-Tieren waren nach einer RIO-Behandlung nicht mehr vorhanden, was vermuten lässt, dass dieser eventuell kompensatorische Mechanismus nicht mehr erforderlich war bzw. bekräftigt, dass eine RIO-Behandlung den gestörten Signalweg wieder ins Gleichgewicht bringt.

Das Ansteuern von cGMP zur Behandlung einer HI ist bis heute wesentlicher Gegenstand der klinischen Forschung [233]. Experimentelle Studien deuten darauf hin, dass cGMP und die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (cGKI/PKG) die kardiale Hypertrophie, Fibrose und HI reduzieren und somit die Herzfunktion verbessern können [63]. Mehrere Studien zeigten kardioprotektive Effekte der Modulation des NO-sGC-cGMP-Signalweges, entweder durch pharmakologische Modulatoren der NO-GC [70, 173, 234, 235] oder durch Inhibitoren der cGMP-degradierenden PDEs [63, 236-239]. Ob diese Effekte allerdings von einer Aktivierung der PKG herrühren oder ob andere nachgeschaltete Effektoren beteiligt sind, bedarf weiterer Untersuchungen [240-242]. In diesem Zusammenhang wird die Rolle von cGKI/PKG kontrovers diskutiert. Interessanterweise hatte die Deletion von cGKI $\alpha$  in Versuchstieren keinen Einfluss auf die durch Isoprenalin oder TAC-induzierte kardiale Hypertrophie [243]. Die meisten der zuvor beschriebenen protektiven Effekte von sGC-Modulatoren sind deskriptiv, und es fehlen weitere Untersuchungen der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen. Die Tatsache, dass die protektiven anti-fibrotischen und anti-hypertrophen Effekte von sGC-Modulatoren durch NO-Donatoren, PDE5-Inhibitoren oder zellpermeable cGMP-Analoga nachgeahmt oder verstärkt, sowie durch PKG-Inhibitoren gehemmt werden können, deutet jedoch stark darauf hin, dass die Effekte primär über die Erhöhung von cGMP vermittelt werden.

In dieser Arbeit wurden sowohl RNA-Seq als auch Massenspektrometrie verwendet, um LV Genexpressionsprofile respektive Proteinprofile nach TAC-induzierter HI im Zusammenhang mit einer RIO-Behandlung zu charakterisieren und zu vergleichen. Lange Zeit galt die implizite Annahme,



dass mRNA-Expression und Proteinsynthese, die in Geweben gemessen wurden, proportional in Beziehung zueinanderstehen und deshalb Transkriptom und Proteom unabhängig voneinander betrachtet werden können [244]. In den letzten Jahren wurde jedoch immer mehr die grundlegende Frage diskutiert, wie die molekularen Mechanismen, die die Transkription von mRNA und die Translation von Proteinen steuern, zusammenhängen. Allerdings gibt es immer wieder widersprüchliche Berichte, die von Beobachtungen reichen, dass *steady-state* Transkriptlevel als Näherungswerte bzw. stellvertretend für Proteinlevel verwendet werden können [245, 246], über Beobachtungen einer korrelierten Umstrukturierung von RNA- und Proteinexpression, wobei immerhin die meisten Proteinexpressionen dynamisch transkriptionsgesteuert sind [247], bis hin zu einer durchgängigen Diskrepanz und Nichtübereinstimmung von mRNA- und Proteinmengen, wodurch Transkriptlevel nicht ausreichend sind, um Proteinlevel vorhersagen zu können [248]. Korrelationen zwischen mRNA- und Proteinleveln können aber aufgrund verschiedener Faktoren, wie unterschiedlicher Halbwertszeiten und der post-transkriptionalen Maschinerie gering sein [244].

Die hier dargestellten Korrelationen zwischen Transkriptom und Proteom (Abb. 4.29) waren eher moderat bis schwach [249] und auch die Schnittmengen von signifikant veränderten Transkripten und Proteinen über die verschiedenen Gruppenvergleiche hinweg waren nur sehr gering (Abb. 4.28). Was an dieser Stelle allerdings zu betonen wäre, ist, dass die Korrelationen von molekularen Veränderungen aufgrund von TAC ( $TAC_{LM}$  vs.  $Sham_{LM}$ ,  $TAC_{RIO}$  vs.  $Sham_{RIO}$ ) deutlich stärker und signifikanter waren als die von RIO aus den direkten Vergleichen ( $TAC_{RIO}$  vs.  $TAC_{LM}$ ,  $Sham_{RIO}$  vs.  $Sham_{LM}$ ). Dies könnte darauf hindeuten, dass vor allem sehr starke Reize bzw. Stimuli wie TAC auch gleichsam oder zumindest ähnlich stark sowohl in Transkriptom als auch Proteom sichtbar werden. Im Umkehrschluss könnte demnach eine weniger starke Korrelation ein Hinweis auf weniger starke Effekte, wie z.B. durch eine Medikation, darstellen. Dies würde die zuvor bereits aufgestellte Hypothese stützen, dass RIO vielleicht doch nur einen eher marginalen Einfluss auf den murinen Organismus hat. Eine nähere Betrachtung der insgesamt in beiden Datensätzen übereinstimmend identifizierten Transkripte bzw. Proteine konnte zeigen, dass nur ungefähr zwei Drittel eine identische Regulationsausrichtung aufwiesen und 30-40% der Befunde invers waren (Tab. 4.5). Dies unterstützt erst einmal die Behauptung der schwachen Korrelation zwischen mRNA-Expression und Proteinabundanz [250]. Unter Berücksichtigung strenger statistischer Signifikanzgrenzen sinkt zwar die Schnittmenge drastisch, jedoch nähert sich die Menge an vergleichbaren und identischen Regulationsausrichtungen fast den 100% (Abb. 4.28, Tab. 4.5, unterer Teil). Dies unterstreicht nicht nur die Bedeutung von statistischer Robustheit bei globalen Omics-Analysen, sondern auch deren Relevanz bei vergleichenden Analysen von Transkriptom und Proteom. Wie Haider und Pal bereits

2013 in ihren 8 möglichen Konzepten der integrativen und vergleichenden Analyse von Transkriptom- und Proteomdaten zusammenfassten, sind nicht nur generelle molekulare Schnittmengen und deren Korrelation zwischen beiden Analysemethoden entscheidend [244]. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist der funktionelle Kontext und die Identifizierung möglicher Überschneidungen verschiedener funktioneller Ebenen und Kategorien, auch wenn unterschiedliche Moleküle aus Transkriptom- oder Proteomanalysen identifiziert und zugeordnet waren. So konnten in der vorliegenden Arbeit sowohl gleiche (Tab. 4.6) als auch ähnliche (Abb. 4.9, 4.12, 4.20, 4.24) funktionelle Kategorien identifiziert werden, die bestätigen bzw. aufzeigen konnten, dass die TAC-induzierten Veränderungen durch RIO reduziert und abgeschwächt werden konnten. Auch wenn einige signifikante Änderungen nach RIO-Behandlung in Sham Tieren auftraten, wurden starke Änderungen, die auf eventuell unerwünschte Nebeneffekte der RIO-Behandlung hinweisen, nicht detektiert. Transkriptom- und Proteomanalysen, wenn auch teilweise unterschiedlich, stützen und ergänzen sich gegenseitig in ihren Aussagen. Nichtsdestotrotz stellen diese Endpunktanalysen nur eine Momentaufnahme dar, die nicht unbedingt ausreichend ist, um das komplexe Netzwerk der Genexpression von Transkription zu Translation sowie post-transkriptionaler und –translationaler Modifikationen im Ganzen zu erfassen. Integrative und zeitpunktabhängige Analysen könnten helfen, um ein besseres Verständnis für die Interaktionen in und zwischen Transkriptom und Proteom zu erhalten [251].

### **5.3 Rolle der microRNA bei kardialem Remodeling nach TAC und unter RIO-Behandlung**

MicroRNAs können an der Regulation von proteinkodierenden Zielgenen mitwirken, die an verschiedenen biologischen Prozessen beteiligt sind und spielen dabei ebenfalls eine zentrale Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen. Sie binden überwiegend, entweder perfekt oder teilweise, komplementäre *messenger*-RNA (mRNA), was entweder zur Degradation der mRNA oder zur Hemmung der Translation führt [110]. Auch wenn die Paarungen zwischen *Target* und microRNA nicht vollständig komplementär sein müssen, so müssen die Nukleotide 2-7 der microRNA (die sog. „Seed“-Region) in jedem Fall perfekt bzw. annähernd perfekt paaren [252]. Anfangs wurde vermutet, dass microRNAs allgemein in Tieren hauptsächlich die Proteintranslation inhibieren [253]. Spätere Untersuchungen konnten hingegen zeigen, dass microRNAs scheinbar doch hauptsächlich die Menge der entsprechenden *Target*-mRNA durch mRNA-Destabilisierung verringern, und nur einen geringen bis moderaten Effekt auf die Translationseffizienz haben [254]. Obwohl die komplexen

microRNA-vermittelten *Silencing*-Mechanismen mittlerweile aufgedeckt und beschrieben sind, so bleibt es immer noch umstritten, in welchem Maße die post-transkriptionale Regulation durch microRNAs durch mRNA-Degradation, Translationsinhibition oder einer Kombination aus beidem erreicht wird [255]. In der vorliegenden Arbeit wurden daher microRNA-*Target*-Beziehungen sowohl in Kombination mit den Transkriptom- als auch mit den Proteomdaten betrachtet.

Die mit dieser Arbeit vorliegenden microRNA-Expressions- und funktionellen Analysen bekräftigen die Beteiligung von microRNAs an der Entwicklung und den verschiedenen Manifestationen kardiovaskulärer Erkrankungen [256]. Anreicherungsanalysen zu entsprechenden Signalwegen aus der KEGG-Datenbank (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) konnten zeigen, dass verschiedenste kardiovaskuläre Signalwege nach TAC-induzierter HI mit Änderungen der microRNA-Expression einhergehen (Abb. 4.34). So waren die meisten durch TAC veränderten microRNAs z.B. mit den Kategorien *Adrenergic Signaling in Cardiomyocytes*, *ErbB Signaling*, und *Cholinergic Synapse* assoziiert (Abb. 4.34A, B). Kardiomyozyten besitzen mindestens sechs Subtypen von adrenergen Rezeptoren (AR), darunter drei Subtypen des beta-AR ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ) und drei Subtypen des alpha-1-AR ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ), wobei im menschlichen Herzen der  $\beta_1$ -AR überwiegt ([www.genome.jp/kegg/](http://www.genome.jp/kegg/)).  $\beta_1$  und  $\beta_2$  gelten als die wichtigsten kardialen ARs, da sie die Herzfrequenz und Stärke der Kontraktion kontrollieren [257]. Bei der HI kommt es, unter anderem durch chronische Drucküberlastung, zur Aktivierung bzw. Überfunktion verschiedener neurohormonaler Signalwege, wobei der Sympathikus bzw. das sympathische adrenerge Nervensystem jedoch am bedeutsamsten ist, und akut die sogenannte „*fight-or-flight*“ Antwort des Körpers stimuliert [258]. Eine chronische  $\beta$ -AR-Stimulation durch erhöhte Level von Katecholaminen, wie Adrenalin und Noradrenalin, ist allerdings schädlich und fördert Hypertrophie, Fibrose und Nekrose. Des Weiteren führt diese chronische Stimulation in Folge zu einer verringerten Dichte und Desensibilisierung der  $\beta$ -AR, was zu einer deutlich reduzierten  $\beta$ -AR-Kontraktionsantwort führt [259, 260]. Hou et al. konnten bereits 2012 in einem Rattenmodell zeigen, dass verschiedene  $\beta$ -adrenerge Interventionen das kardiale LV microRNA-Expressionsprofil veränderten und microRNAs vermutlich an der  $\beta$ -AR-Signalkaskade beteiligt sein könnten, wodurch sich ein neues Feld zur Modulation bzw. Regulierung der  $\beta$ -AR-Funktion eröffnen würde [261]. In der vorliegenden Arbeit waren mehr als die Hälfte der durch TAC signifikant veränderten microRNAs ( $n = 23$ , Abb. 4.34A, B) mit dem adrenergen Signaling assoziiert. Davon stimmen viele mit den bereits von Hou et al. identifizierten microRNAs überein (z.B. „miR-24-3p“, „miR-27b-3p“, „miR-30c“, „miR-34c-5p“, „miR-212-3p“, „miR-214“, „miR-221“), wovon im Folgenden noch einige im Detail diskutiert werden. Im Verlauf der letzten Jahre konnten mehrere Arbeiten für verschiedene microRNAs deren Einfluss auf diese Signalkaskade bestätigen. So konnte

in einer Studie von 2016 z.B. gezeigt werden, dass der  $\beta$ -AR-Antagonist ( $\beta$ -Blocker) Carvedilol in einem murinen Ischämie-Reperusionsmodell „miR-214“ in Kardiomyozyten hochreguliert und die Aktivierung dieser microRNA über die Repression der apoptotischen Zielgene *Ddit4* und *Ing4* zumindest teilweise ihren protektiven und Carvedilol-responsiven Effekt vermittelt. Auch konnte hierbei eine Überexpression von „miR-214“ in Kardiomyozyten *in vitro* den protektiven Effekt von Carvedilol nachahmen und als Antwort auf ischämische Schädigung das p-AKT *Survival Signaling* aktivieren [262]. Durch ihre inhibierende Funktionsweise wirken diese microRNAs scheinbar hauptsächlich protektiv bzw. als eine Art Feinregulator als Reaktion auf die Erfordernisse der entsprechenden physiologischen Funktionen *in vivo* [262-266]. Diese negative Rückkopplungsschleife trägt wahrscheinlich zur Feinabstimmung des Systems bei, die für microRNAs charakteristisch ist und eine gezielte Regulation komplexer biologischer Prozesse ermöglicht [267]. Dies deckt sich ebenfalls mit der Beobachtung, dass fast alle der identifizierten 23 durch TAC veränderten microRNAs hochreguliert waren (n = 17, Abb. 4.34A, B).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine RIO-Behandlung einen abschwächenden bzw. revertierenden Effekt auf die linksventrikulären microRNA-Expressionsprofile im TAC-Modell hatte (Tab. 4.7, Abb. 4.31, 4.34), was einen direkten Einfluss der Medikation auf die Expression von microRNAs vermuten lässt. Auch ließen nachfolgende funktionelle Analysen basierend auf den mittels IPA®'s Target Filter identifizierten inversen Expressionspaarungen zwischen microRNAs und mRNAs aus den Sequenzierungsanalysen zum Teil darauf schließen, dass die beobachteten microRNA-Expressionsveränderungen nach einer RIO-Behandlung an den abgemilderten TAC-induzierten Effekten auf Transkriptomebene beteiligt sind (Tab. 4.10). Unter anderem schienen microRNAs z.B. einen starken Einfluss auf mRNA-*Targets* zu haben, die energiemetabolischen Prozessen wie dem Citratzyklus zugeordnet werden konnten. So zeigte sich eine microRNA-assoziierte Hemmung dieser Stoffwechselwege nach TAC, die nach RIO-Medikation in den TAC-Tieren kaum noch zu beobachten war. Das gleiche traf auch auf mRNA-*Targets* mit Bezug zu CVD-assoziierten Signalwegen zu (Abb. 4.35, 4.36). Überraschenderweise zeigte jedoch eine nähere Betrachtung inverser Paarungen, dass potentielle microRNA-mRNA-Interaktionen hauptsächlich auf reduzierten microRNA-Leveln und damit einhergehenden erhöhten Transkriptmengen basierten und nicht, wie erwartet, hauptsächlich inverse Paarungen von hochregulierten microRNAs und herunterregulierten mRNAs auftraten (Tab. 4.11A, B). Aus der Literatur ist allerdings bekannt, dass verschiedene microRNAs bei kardiovaskulären Erkrankungen vermindert exprimiert werden, wie zum Beispiel „miR-148a“ und die microRNA-Familie „miR-30“, für die auch in der vorliegenden Arbeit geringere Expressionslevel nach TAC identifiziert wurden [256, 268]. So könnte eher

geschlussfolgert werden, dass die beobachteten Effekte nach TAC oder einer RIO-Medikation nicht maßgeblich über eine microRNA-initiierte mRNA-Degradation reguliert werden. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass microRNAs eher marginale Auswirkungen auf die Menge entsprechender mRNA-*Targets* haben und eventuell eher als eine Art Feinregulator in direkter Weise auf das Transkriptom wirken. Auch die Betrachtung der am stärksten nach TAC hochregulierten microRNAs bestärkt diese Vermutung, da deren mRNA-*Targets* alle weniger als 2fach verringerte mRNA-Level aufwiesen (Tab. 12A, B).

Mehrere Studien haben bisher die Beziehung zwischen microRNAs und ihren *Targets* unter Verwendung von mRNA- und microRNA-Expressionsdaten untersucht [269-272]. Allerdings repräsentieren die mRNA-Level nicht unbedingt die exakten Proteinmengen, da die Proteintranslation auf verschiedene Weise reguliert werden kann [273, 274]. Dennoch wurden umfangreiche Proteomdaten bisher nur selten zur Prädiktion von microRNA-Beziehungen bzw. -Regulationen herangezogen, obwohl sich die offensichtlichen Effekte einer veränderten microRNA-Expression und ihrer Zielgenregulation in den translatierten Proteinen widerspiegeln sollte [275]. Aus verschiedenen Versuchstierstudien, ähnlich zu dem hier verwendeten TAC-Modell, ist bekannt, dass einzelne microRNAs, wie z.B. „miR-27b“, „miR-199a“ und „miR-208b“, bei CVD assoziierten Erkrankungen hochreguliert sind [276-278]. Diese zeigten auch in der vorliegenden Arbeit eine Zunahme nach TAC und waren nach RIO in TAC-Tieren abgeschwächt exprimiert (Tab. 4.7, 4.14, Abb. 4.34). Durch Überexpression in transgenen Mäusen konnte z.B. gezeigt werden, dass „miR-27b“ *in vivo* prohypertroph wirkt und ihre Hemmung die kardiale Hypertrophie und Dysfunktion nach TAC abschwächt [279]. Außerdem ist bekannt, dass „miR-199a“ bei kardialer Hypertrophie und HI hochreguliert wird [280]. Interessanterweise ist diese microRNA mit der Abnahme bzw. Verringerung der mitochondrialen Fettsäureoxidation unter hämodynamischem Stress nach TAC assoziiert. Indem sie den *Peroxisome proliferator-activator receptor δ* (*Pparδ*) als kritischen Regulator des Energiestoffwechsels im Herzen angreift und unterdrückt, ermöglicht „miR-199a“ eine metabolische Verschiebung weg von der vorherrschenden Abhängigkeit von der Fettsäureverwertung [281]. Dies steht ebenfalls im Einklang mit den Ergebnissen der Proteomanalysen, die auf eine Beeinträchtigung der  $\beta$ -Oxidation hinwiesen, was die Beteiligung und Bedeutung einer microRNA-assoziierten Hemmung als einen möglichen Regulationsmechanismus stützt. Darüber hinaus waren die microRNA und das Protein, die mit den stärksten Veränderungen aufgrund von TAC identifiziert wurden, „miR-208b“ bzw. MYH7 (Tab. 4.7, Abb. 4.25). Interessanterweise wurde der TAC-induzierte Anstieg von „miR-208b“ und MYH7 durch RIO gleichermaßen stark abgeschwächt, was die Vermutung nahelegte, dass die Regulation von beiden

eng miteinander verbunden sein könnte. Eine genauere Literaturrecherche und Überprüfung in NCBI's *Gene*-Datenbank für murine und ebenfalls humane Einträge bestätigte diese Vermutung. Die microRNA „miR-208b“ wird vom Gen für Myosin-7 (*Myh7*, *MYH7*) kodiert und verläuft damit parallel zur Expression seines Wirtsgens (*Host Gene*) [282]. Als Teil des sogenannten „MyomiR“-Regulationsnetzwerkes von microRNAs, die innerhalb der entsprechenden Myosin-Gene lokalisiert sind und mit diesen koexprimiert werden, werden *Myh7/miR-208b* nur bei Stress exprimiert und scheinen somit die kardiale Genexpression an physiologische bzw. pathologische Bedingungen anzupassen [283]. Darüber hinaus zeigten Zhou et al., dass die Hemmung von „miR-208b“ in einem Mausmodell der dilatativen Kardiomyopathie den Übergang von adaptivem zu maladaptivem Remodeling verhindert und die Herzfunktion verbessert [284]. Zusätzlich unterdrückt „miR-208b“ auch die Repressoren von *Myh7* (*Sox6*, *Purβ*, *Sp3*), was die Expression von *Myh7* selbst fördert und damit zur Aufrechterhaltung des fetalen „Genswitches“ beiträgt [285, 286]. Eine weitere Verbindung besteht zwischen ANKRD1 und „miR-199a“, wobei sich „miR-199a“ gegen das *Ankrd1*-Transkript richtet. Allerdings zeigte ANKRD1, wie zuvor bereits beschrieben, eine erhöhte Abundanz in TAC-Mäusen. Somit könnte eine Hochregulierung von „miR-199a“ in hypertrophen Herzen Teil einer kompensatorischen Reaktion sein, um einer Überinduktion von ANKRD1 entgegenzuwirken [223]. Auch PLN scheint mit „miR-21a“ einen interessanten microRNA-Antagonisten zu besitzen. Diese microRNA wurde stark erhöht nach TAC identifiziert, jedoch nicht mehr nach einer RIO-Behandlung (Tab. 4.7). Wie bereits diskutiert, zeigte PLN nach TAC eine verringerte Abundanz zusammen mit einer stärkeren Phosphorylierung, was beides zur Hemmung von PLN führt (Abb. 4.25, 4.26, 4.27). Auch „miR-21a“ kann zur Hemmung von PLN beitragen, interessanterweise allerdings über einen *Off-Target*-Effekt. Soller et al. konnten zeigen, dass diese microRNA direkt an PLN als Protein binden kann und damit dessen Funktion über eine direkte physikalische Interaktion hemmt [287]. Aus den Target Filter Analysen zwischen microRNA und Proteomdatensatz (Tab. 4.14, Abb. 4.37) wurden sowohl „miR-21a“ als auch „miR-27b“ als potentielle Interaktionspartner für das Transkript von Sarcalumenin (SAR) identifiziert, was sich in einer Abnahme der Proteinabundanz nach TAC widerspiegelte. Wie Shimura et al. zeigen konnten, trägt SAR durch Interaktion mit SERCA2a zum Ca<sup>2+</sup>-Handling und dessen Sequestrierung in das kardiale SR bei und ist nach TAC in Mäusen herunterreguliert [288]. Die beobachteten moderaten und inversen Veränderungen von SAR nach RIO-Behandlung in TAC-Tieren könnten eventuell an der beschriebenen Erholung der LV Funktion beteiligt sein. Die verminderte Expression von „miR-21a“ und „miR-27b“ nach RIO könnte dabei auf eine Regulierung von SAR auf microRNA-Ebene und einen direkten Zusammenhang mit der RIO-Behandlung hinweisen.

Basierend auf den Proteomdaten lassen die negativen Korrelationen zwischen microRNAs und deren *Targets* eine generelle Regulation von Proteinen vermuten, die an der mitochondrialen Energieproduktion und metabolischen Prozessen beteiligt sind (Tab. 4.14, Abb. 4.37). Dies steht im Einklang mit der aktuellen Literatur und ist bereits seit längerem im Fokus der Forschung [280, 289]. Diese sogenannten „MitomiRs“ gewinnen immer mehr als vielversprechende microRNA-basierte Therapieansätze für die Behandlung von CVD, aber auch anderer humaner Erkrankungen wie Krebs und Gefäßerkrankungen, an Bedeutung [289]. So verringerte z.B. eine Hemmung von „miR-21“ (frühere ID von „miR-21a“) die Hypoxie-induzierte Vasokonstriktion und nachfolgendes vaskuläres Remodeling im Mausmodell *in vivo* [290]. Die beobachteten verringerten Expressionslevel dieser microRNAs in RIO-behandelten TAC-Tieren scheinen demnach ebenfalls einen positiven Behandlungseffekt durch RIO auf das regulatorische Netzwerk der „MitomiRs“ nach TAC-induzierter HI zu beschreiben. Unter Berücksichtigung der eher moderaten Veränderungen der identifizierten Targets auf Proteinebene (Tab. 4.14, Abb. 4.37, S8) wird allerdings die zuvor bereits erwähnte Vermutung bekräftigt, dass microRNA-assoziierte Regulationen vielmehr zur Feinabstimmung molekularer Mechanismen beitragen als dass sie starke Veränderungen auslösen.

Überraschenderweise ist für einige der identifizierten microRNAs mit den stärksten Expressionsänderungen nach TAC, die eine Abschwächung durch RIO aufwiesen („miR-7688-5p“, „miR-6944-3p“, „miR-9769-3p“), fast nichts aus der Literatur bekannt. Unter Berücksichtigung der Namensgebung von microRNAs und ihrer einfach fortlaufenden Nummerierung beschreiben diese Beispiele erst kürzlich entdeckte microRNAs aufgrund der hohen Nummerierung [291]. Nichtsdestotrotz scheinen diese microRNAs aufgrund ihrer starken Veränderung durch TAC einerseits und der Abschwächung nach einer RIO-Behandlung andererseits von besonderer Bedeutung zu sein und stellen daher sehr interessante Ziele für zukünftige, genauere Untersuchungen insbesondere im Bereich der kardiovaskulären Forschung dar.

Ebenfalls wurde beobachtet, dass eine RIO-Behandlung nach TAC auch die Expression bestimmter microRNAs verstärkte. Insbesondere „miR-24“ und „miR-122“ wurden in TAC-Mäusen nach RIO-Behandlung stärker exprimiert. Diese microRNAs zeigten bereits in verschiedenen Nagetiermodellen anti-fibrotische Eigenschaften, was auf einen Einfluss von RIO auf microRNA-assoziierten fibrotischen Umbau hindeutet [292, 293]. Darüber hinaus stehen diese sog. „FibromiRs“ ebenfalls seit geraumer Zeit besonders im Fokus hinsichtlich ihres Potenzials bei der Entwicklung von anti-fibrotischen Medikamenten [294].

## 5.4 Schlussfolgerungen, Limitationen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation der sGC mittels RIO positive Auswirkungen auf das pathologische kardiale Remodeling hatte. Neben verbesserter Herzfunktion und verringerter Hypertrophie und Fibrosierung, zeigte sich ebenfalls eine Reduktion der Veränderungen der linksventrikulären Genexpressionsmuster, der an TAC-induzierter chronischer Drucküberlastung leidenden Mäuse, nach medikamentöser Behandlung [295]. Dies steht ebenfalls im Einklang mit den weiteren Ergebnissen, dass RIO CVD assoziierte Signalwege, biologische Prozesse und Funktionen, die durch TAC beeinflusst waren, abschwächte bzw. zu einer gewissen Reversion in microRNA-Expressions- und Proteinmustern führte [296].

Aufgrund der bemerkenswerten Verbesserung der kardialen Funktionsparameter und der beobachteten Rückbildung von Fibrose und Hypertrophie durch die Medikation wurden ebenfalls viele und starke Unterschiede auf molekularer Ebene zwischen den beiden Gruppen von behandelten und unbehandelten TAC-Tieren erwartet ( $TAC_{RIO}$  vs.  $TAC_{LM}$ ). In diesem direkten Vergleich wurden jedoch nur moderate molekulare Veränderungen sowohl auf Genexpressionsebene (Abb. 4.6), Proteinebene (Abb. 4.18) als auch microRNA-Expressionsebene (Abb. 4.32) beobachtet. Daher lag der Fokus der Analysen hauptsächlich auf einem indirekten Vergleich in der Gegenüberstellung von TAC-induzierten Veränderungen zwischen unbehandelten ( $TAC_{LM}$  vs.  $Sham_{LM}$ ) und behandelten ( $TAC_{RIO}$  vs.  $Sham_{RIO}$ ) Tieren. Hierbei wurden die revertierenden Effekte auf Transkriptom-, Proteom und microRNA-Ebene und den damit verbundenen biologischen Funktionen bzw. Signalwegen deutlicher. Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass die Effekte einer RIO-Medikation nach TAC nicht so stark waren, wie erwartet, und sich nicht in einer Revertierung bzw. Aufhebung der pathologischen Prozesse zeigten, sondern eher eine Stagnation der Krankheitsprogression darstellten. Die Medikation begann mit postoperativem Tag 21, als Hypertrophie und Fibrose als kompensatorische Prozesse aufgrund der induzierten Nachlasterhöhung bereits messbar und signifikant etabliert waren. Unter besonders kritischer Betrachtung der Funktions- und Histologiedaten muss daher auch hier festgehalten werden, dass sich die krankhaften Veränderungen zwar verbesserten, letztendlich aber nicht wieder die gesunden Ausgangsniveaus erreichten. Eine aktuelle Übersichtsarbeit und Metaanalyse über die Wirksamkeit und Sicherheit von sGC-Stimulatoren bei HI-Patienten unterstützt deren Verwendung als neuartige Anti-HI-Medikamente. Jedoch befürworten die Autoren diese eher als nützliche Zusatztherapie [297]. Auch wenn sGC-Stimulatoren hier weder signifikant vorteilhafte noch nachteilige Auswirkungen auf die Patientensterblichkeit hatten, so kamen die Autoren doch zu dem



Schluss, dass sGC-Stimulatoren die Lebensqualität von Patienten mit HI verbessern. Eine Behandlung mit RIO hatte wenige bis keine Auswirkungen auf gesunde Sham-Tiere. Weder in den funktionellen Parametern, noch in den molekularen Analysen wurden starke Veränderungen beobachtet. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Daten aus frühen klinischen Studien auf dem Weg zur Zulassung als Arzneimittel, die zeigten, dass RIO bei gesunden männlichen Probanden ohne schwerwiegende negative Nebenwirkungen gut verträglich war [298]. Die wenigen Veränderungen auf molekularer Ebene stützen demnach die gute Verträglichkeit dieses Medikaments, die schließlich auch in weiteren Studien der Phase 3, wie z.B. der PATENT-1- und 2-Studie und der CHEST-1 und 2-Studie erneut auch bei Patienten bestätigt wurde [299-302].

Um kardiovaskuläre Begleiterscheinungen einer RIO-Medikation zu erkennen, wurden Herzfrequenz gemessen und Aortendruck bestimmt, der aus der via PW-Doppler aufgezeichneten Flussgeschwindigkeit an der Aorta berechnet wurde (Abb. 4.1, 4.2) [303]. Wie zuvor bereits erwähnt, stand allerdings kein invasives hämodynamisches Monitoring zur Verfügung, um Änderungen des Blutdrucks direkt bei den Tieren zu messen. Aufgrund der vasodilatatorischen Wirkung von RIO kann die fehlende Blutdruckmessung allerdings als Limitation angesehen werden. Auch wenn die Drucküberlastung und damit auch die Nachlast auf die linken Ventrikel durch TAC immer konstant war, kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass periphere vaskuläre Effekte eventuell teilweise zu den positiven Effekten von RIO im verwendeten HI-Modell beigetragen haben können. Auch wurden in dieser Studie nur männliche Mäuse untersucht, da sie einen stärker ausgeprägten Phänotyp nach TAC zeigen. Eventuell von den Befunden abweichende Auswirkungen einer RIO-Behandlung auf weibliche Mäuse können daher nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren wurde für die molekularen Analysen das gesamte linksventrikuläre Gewebe genutzt, wodurch nicht zwischen den verschiedenen kardialen Zelltypen und deren Beteiligung an den positiven Effekten durch die Behandlung differenziert werden kann. Darüber hinaus ist es nicht möglich zu schlussfolgern, welche spezifische Genregulation als Reaktion auf die sGC-Stimulation ursächlich zum Schutz gegen die TAC-induzierte HI beigetragen hat. Diesbezüglich findet ein komplexes Zusammenspiel im Gesamtnetzwerk der Genregulation statt und bedarf weiterer *in vivo* und *in vitro* Analysen. Die stetige Weiterentwicklung und Verbesserung von Omics-basierten Analysemethoden, aber auch Fortschritte in der Einzelzellisolation und Barcoding-Technologien haben z.B. bemerkenswerte Möglichkeiten für die integrative Analyse von Einzelzell-Multi-Omics-Daten geschaffen. Sie bieten den Vorteil, Zelltypen und ihre Funktionen in Bezug auf pathophysiologische Prozesse auf der Grundlage von molekularen Signaturen charakterisieren zu können [304]. Insbesondere im Hinblick auf das komplexe Feld der microRNAs erscheinen hierbei weitere und

zukünftige Experimente sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als essentiell [305]. Auch wenn die identifizierten, differentiell veränderten microRNAs sowohl dem Transkriptom als auch Proteom durch Target-Interaktionsanalysen in dieser Arbeit gegenübergestellt wurden, so bedarf es doch weiterer Untersuchungen, um diese Befunde auch zu validieren. Obwohl sich die hier dargestellten Ergebnisse dazu mit vielen anderen Studien decken, lassen vor allem fehlende zelltypspezifische Untersuchungen doch viele Fragen offen [306].

Neben der Verwendung für die Behandlung der PAH (*pulmonary arterial hypertension*) ist Riociguat derzeit das einzige Medikament, das auch für die Behandlung der CTEPH (*chronic thromboembolic pulmonary hypertension*) genutzt werden kann, mit Zulassungen in den USA und der EU sowie in vielen anderen Ländern [307-309]. In ersten klinischen Studien wurde die Wirkung von sGC-Stimulatoren aber auch bei Patienten mit Herzinsuffizienz mit verringerter Ejektionsfraktion (HFrEF, *heart failure with reduced ejection fraction*) untersucht, und es konnte gezeigt werden, dass RIO den Herzindex und die Lebensqualität von Patienten mit HFrEF und sekundärer pulmonaler Hypertonie verbesserte [310-314]. Aufgrund der relativ geringen Halbwertszeit von RIO und dessen pharmakokinetischen Profils im Menschen ist eine Verabreichung bei Patienten dreimal täglich erforderlich [315]. Als Ergebnis von Optimierungsansätzen zur Identifizierung oral bioverfügbarer sGC-Stimulatoren mit einer längeren Wirkdauer als Riociguat wurde Vericiguat, ein neuartiger sGC-Stimulator mit optimierten pharmakokinetischen Eigenschaften, die die täglich einmalige Dosierung ermöglichen, entwickelt [75]. Basierend auf den Ergebnissen der Phase 3 VICTORIA-Studie wurde Vericiguat erst kürzlich (Januar 2021) durch die FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) in den USA bei Patienten mit HI und einer EF < 45% zugelassen [316]. Eine Überprüfung durch die europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) stand im Mai 2021 allerdings noch aus, jedoch wurde eine Zulassung für die Behandlung der HI mittlerweile (Juli 2021) erteilt [317, 318]. Weitere vergleichende präklinische *in vivo* und *in vitro* Studien könnten in Betracht gezogen werden, um weitere unterschiedliche Wirkweisen von Vericiguat zu untersuchen. Unter Verwendung von Riociguat und Vericiguat könnten so z.B. Studien durchgeführt werden, um zu evaluieren, ob sich funktionelle und molekulare Verbesserungen nach TAC zwischen den beiden Medikamenten unterscheiden und ob eine Vericiguatbehandlung möglicherweise zu einer erhöhten Überlebensrate der Tiere beiträgt. Weiter könnten sich zukünftige Studien mit der Fragestellung befassen, ob eine Behandlung mit RIO oder anderen sGC-Stimulatoren auch positive Auswirkungen bei weiter fortgeschrittenen Stadien der HI hätte. Auch könnte die Messung der cGMP-Level nach Medikamentverabreichung Aufschluss darüber geben, ob eine Behandlung mit Riociguat oder Vericiguat die Menge an cGMP in unterschiedlichem Maße erhöht. Im Gegensatz zur Messung des Gesamtgehaltes von Kollagen auf

Grundlage von histologischen Färbungen könnte auch das Verhältnis von Kollagen Typ I zu Typ III analysiert werden. Da Kollagen Typ III elastischer ist als Typ I, könnte eine eventuell zusätzliche Verschiebung von Typ I zu III eine funktionelle Verbesserung noch differenzierter erklären und weiter stützen.

Aufgrund der starken Effekte von RIO auf die kardiale Struktur und Funktion im verwendeten HI-Mausmodell wurden relativ viele und starke molekulare Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten TAC-Tieren erwartet. Die beobachteten molekularen Veränderungen waren jedoch eher moderat. Nichtsdestotrotz schwächte eine RIO-Behandlung die TAC-induzierten Veränderungen der LV Genexpressions-, Protein- und microRNA-Muster und die damit verbundenen funktionellen Störungen während der chronischen drucküberlastungsinduzierten HI ab. In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass der sGC-Stimulator Riociguat positive Effekte auf den pathologischen kardialen Umbau hatte. Die Ergebnisse implizieren ebenfalls, dass auch kleine Korrekturen im LV Proteom, Transkriptom und auf microRNA-Ebene durch RIO große Auswirkungen auf die Herzfunktion bei TAC-induzierter HI haben könnten. Zugleich wurden mit dieser Studie große Omics-Datensätze generiert, die als Informationsquelle zukünftigen Untersuchungen helfen können, die molekularen Mechanismen der chronischen HI und möglicher therapeutischer, medikamentöser Interventionen besser zu verstehen und weiter zu entschlüsseln.



## 6. Literaturverzeichnis

1. Ambrosy, A.P., Fonarow, G.C., Butler, J., Chioncel, O., Greene, S.J., Vaduganathan, M., Nodari, S., Lam, C.S.P., Sato, N., Shah, A.N., and Gheorghiade, M., *The Global Health and Economic Burden of Hospitalizations for Heart Failure: Lessons Learned From Hospitalized Heart Failure Registries*. J Am Coll Cardiol, 2014. 63(12): p. 1123-1133.
2. Ponikowski, P., Voors, A.A., Anker, S.D., Bueno, H., Cleland, J.G.F., Coats, A.J.S., Falk, V., González-Juanatey, J.R., Harjola, V.P., Jankowska, E.A., Jessup, M., Linde, C., Nihoyannopoulos, P., Parissis, J.T., Pieske, B., Riley, J.P., Rosano, G.M.C., Ruilope, L.M., Ruschitzka, F., Rutten, F.H., and van der Meer, P., *2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. Eur Heart J, 2016. 37(27): p. 2129-2200.
3. Linden, K., Mailey, J., Kearney, A., and Menown, I.B.A., *Advances in Clinical Cardiology 2019: A Summary of Key Clinical Trials*. Adv Ther, 2020. 37(6): p. 2620-2645.
4. Hoppe, U.C., Böhm, M., Dietz, R., Hanrath, P., Kroemer, H.K., Osterspey, A., Schmaltz, A.A., and Erdmann, E., *[Guidelines for therapy of chronic heart failure]*. Z Kardiol, 2005. 94(8): p. 488-509.
5. National Guideline, C., *National Institute for Health and Care Excellence: Clinical Guidelines, in Chronic Heart Failure in Adults: Diagnosis and Management*. 2018, National Institute for Health and Care Excellence (UK): London.
6. Wu, A., *Heart Failure*. Ann Intern Med, 2018. 168(11): p. Itc81-itc96.
7. Snipelisky, D., Chaudhry, S.P., and Stewart, G.C., *The Many Faces of Heart Failure*. Card Electrophysiol Clin, 2019. 11(1): p. 11-20.
8. Glower, D.D., Spratt, J.A., Snow, N.D., Kabas, J.S., Davis, J.W., Olsen, C.O., Tyson, G.S., Sabiston, D.C., Jr., and Rankin, J.S., *Linearity of the Frank-Starling relationship in the intact heart: the concept of preload recruitable stroke work*. Circulation, 1985. 71(5): p. 994-1009.
9. Konstam, M.A., Kramer, D.G., Patel, A.R., Maron, M.S., and Udelson, J.E., *Left ventricular remodeling in heart failure: current concepts in clinical significance and assessment*. JACC Cardiovasc Imaging, 2011. 4(1): p. 98-108.
10. Hartupee, J. and Mann, D.L., *Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction*. Nat Rev Cardiol, 2017. 14(1): p. 30-38.

11. Riegger, G.A., Muders, F., and Luchner, A., [*Neurohumoral regulation in heart failure*]. *Z Kardiol*, 1996. 85 Suppl 6: p. 205-10.
12. Hirsch, A.T., Dzau, V.J., and Creager, M.A., *Baroreceptor function in congestive heart failure: effect on neurohumoral activation and regional vascular resistance*. *Circulation*, 1987. 75(5 Pt 2): p. Iv36-48.
13. Goldsmith, S.R., *The role of vasopressin in congestive heart failure*. *Cleve Clin J Med*, 2006. 73 Suppl 3: p. S19-23.
14. Haider, A.W., Larson, M.G., Benjamin, E.J., and Levy, D., *Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death*. *J Am Coll Cardiol*, 1998. 32(5): p. 1454-9.
15. Berenji, K., Drazner, M.H., Rothermel, B.A., and Hill, J.A., *Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure?* *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. 289(1): p. H8-h16.
16. Diwan, A. and Dorn, G.W., 2nd, *Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets*. *Physiology (Bethesda)*, 2007. 22: p. 56-64.
17. Cokkinos, D.V. and Pantos, C., *Myocardial remodeling, an overview*. *Heart Fail Rev*, 2011. 16(1): p. 1-4.
18. Heineke, J. and Molkenin, J.D., *Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. 7(8): p. 589-600.
19. Bernardo, B.C., Weeks, K.L., Pretorius, L., and McMullen, J.R., *Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies*. *Pharmacol Ther*, 2010. 128(1): p. 191-227.
20. Maillet, M., van Berlo, J.H., and Molkenin, J.D., *Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013. 14(1): p. 38-48.
21. Kehat, I. and Molkenin, J.D., *Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation*. *Circulation*, 2010. 122(25): p. 2727-35.
22. Teiger, E., Than, V.D., Richard, L., Wisnewsky, C., Tea, B.S., Gaboury, L., Tremblay, J., Schwartz, K., and Hamet, P., *Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat*. *J Clin Invest*, 1996. 97(12): p. 2891-7.
23. Olivetti, G., Abbi, R., Quaini, F., Kajstura, J., Cheng, W., Nitahara, J.A., Quaini, E., Di Loreto, C., Beltrami, C.A., Krajewski, S., Reed, J.C., and Anversa, P., *Apoptosis in the failing human heart*. *N Engl J Med*, 1997. 336(16): p. 1131-41.

24. Benjamin, I.J., Jalil, J.E., Tan, L.B., Cho, K., Weber, K.T., and Clark, W.A., *Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis*. *Circ Res*, 1989. 65(3): p. 657-70.
25. Nakayama, H., Chen, X., Baines, C.P., Klevitsky, R., Zhang, X., Zhang, H., Jaleel, N., Chua, B.H., Hewett, T.E., Robbins, J., Houser, S.R., and Molkentin, J.D., *Ca<sup>2+</sup>- and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure*. *J Clin Invest*, 2007. 117(9): p. 2431-44.
26. McEwan, P.E., Gray, G.A., Sherry, L., Webb, D.J., and Kenyon, C.J., *Differential effects of angiotensin II on cardiac cell proliferation and intramyocardial perivascular fibrosis in vivo*. *Circulation*, 1998. 98(24): p. 2765-73.
27. Sharma, R., Coats, A.J., and Anker, S.D., *The role of inflammatory mediators in chronic heart failure: cytokines, nitric oxide, and endothelin-1*. *Int J Cardiol*, 2000. 72(2): p. 175-86.
28. Berk, B.C., Fujiwara, K., and Lehoux, S., *ECM remodeling in hypertensive heart disease*. *J Clin Invest*, 2007. 117(3): p. 568-75.
29. Gyöngyösi, M., Winkler, J., Ramos, I., Do, Q.T., Firat, H., McDonald, K., González, A., Thum, T., Díez, J., Jaisser, F., Pizard, A., and Zannad, F., *Myocardial fibrosis: biomedical research from bench to bedside*. *Eur J Heart Fail*, 2017. 19(2): p. 177-191.
30. Bertero, E. and Maack, C., *Calcium Signaling and Reactive Oxygen Species in Mitochondria*. *Circ Res*, 2018. 122(10): p. 1460-1478.
31. Rosca, M.G. and Hoppel, C.L., *Mitochondrial dysfunction in heart failure*. *Heart Fail Rev*, 2013. 18(5): p. 607-22.
32. Lai, L., Leone, T.C., Keller, M.P., Martin, O.J., Broman, A.T., Nigro, J., Kapoor, K., Koves, T.R., Stevens, R., Ilkayeva, O.R., Vega, R.B., Attie, A.D., Muoio, D.M., and Kelly, D.P., *Energy metabolic reprogramming in the hypertrophied and early stage failing heart: a multisystems approach*. *Circ Heart Fail*, 2014. 7(6): p. 1022-31.
33. Dirx, E., da Costa Martins, P.A., and De Windt, L.J., *Regulation of fetal gene expression in heart failure*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. 1832(12): p. 2414-24.
34. Wang, X. and Robbins, J., *Heart Failure and Protein Quality Control*. *Circ Res*, 2006. 99(12): p. 1315-1328.
35. Shiojima, I., Sato, K., Izumiya, Y., Schiekofer, S., Ito, M., Liao, R., Colucci, W.S., and Walsh, K., *Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure*. *J Clin Invest*, 2005. 115(8): p. 2108-18.

36. Tarnavski, O., *Mouse surgical models in cardiovascular research*. Methods Mol Biol, 2009. 573: p. 115-37.
37. Janssen, P.M.L. and Elnakish, M.T., *Modeling heart failure in animal models for novel drug discovery and development*. Expert Opin Drug Discov, 2019. 14(4): p. 355-363.
38. deAlmeida, A.C., van Oort, R.J., and Wehrens, X.H., *Transverse aortic constriction in mice*. J Vis Exp, 2010(38).
39. Kemp-Harper, B. and Feil, R., *Meeting report: cGMP matters*. Sci Signal, 2008. 1(9): p. pe12.
40. Marti, C.N., Gheorghiade, M., Kalogeropoulos, A.P., Georgiopoulou, V.V., Quyyumi, A.A., and Butler, J., *Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2012. 60(16): p. 1455-69.
41. Gheorghiade, M., Marti, C.N., Sabbah, H.N., Roessig, L., Greene, S.J., Bohm, M., Burnett, J.C., Campia, U., Cleland, J.G., Collins, S.P., Fonarow, G.C., Levy, P.D., Metra, M., Pitt, B., Ponikowski, P., Sato, N., Voors, A.A., Stasch, J.P., and Butler, J., *Soluble guanylate cyclase: a potential therapeutic target for heart failure*. Heart Fail Rev, 2013. 18(2): p. 123-34.
42. Tsai, E.J. and Kass, D.A., *Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics*. Pharmacol Ther, 2009. 122(3): p. 216-38.
43. McKie, P.M., Schirger, J.A., Costello-Boerrigter, L.C., Benike, S.L., Harstad, L.K., Bailey, K.R., Hodge, D.O., Redfield, M.M., Simari, R.D., Burnett, J.C., Jr., and Chen, H.H., *Impaired natriuretic and renal endocrine response to acute volume expansion in pre-clinical systolic and diastolic dysfunction*. J Am Coll Cardiol, 2011. 58(20): p. 2095-103.
44. Blanton, R.M., *cGMP Signaling and Modulation in Heart Failure*. J Cardiovasc Pharmacol, 2020. 75(5): p. 385-398.
45. Furchgott, R.F. and Zawadzki, J.V., *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. 288(5789): p. 373-6.
46. Palmer, R.M., Ferrige, A.G., and Moncada, S., *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. Nature, 1987. 327(6122): p. 524-6.
47. Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., and Chaudhuri, G., *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(24): p. 9265-9.
48. Schmidt, H.H. and Walter, U., *NO at work*. Cell, 1994. 78(6): p. 919-25.
49. Kim, Y.-M., Bombeck, C.A., and Billiar, T.R., *Nitric Oxide as a Bifunctional Regulator of Apoptosis*. Circ Res, 1999. 84(3): p. 253-256.



50. Umar, S. and van der Laarse, A., *Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart*. Mol Cell Biochem, 2010. 333(1-2): p. 191-201.
51. Shah, A.M. and MacCarthy, P.A., *Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function*. Pharmacol Ther, 2000. 86(1): p. 49-86.
52. Iachini Bellisarii, F., Radico, F., Muscente, F., Horowitz, J., and De Caterina, R., *Nitrates and Other Nitric Oxide Donors in Cardiology - Current Positioning and Perspectives*. Cardiovasc Drugs and Ther, 2012. 26(1): p. 55-69.
53. Münzel, T., Daiber, A., and Mülsch, A., *Explaining the phenomenon of nitrate tolerance*. Circ Res, 2005. 97(7): p. 618-28.
54. Chirkov, Y.Y. and Horowitz, J.D., *Impaired tissue responsiveness to organic nitrates and nitric oxide: A new therapeutic frontier?* Pharmacol Ther, 2007. 116(2): p. 287-305.
55. Pacher, P., Beckman, J.S., and Liaudet, L., *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease*. Physiol Rev, 2007. 87(1): p. 315-424.
56. Evgenov, O.V., Pacher, P., Schmidt, P.M., Haskó, G., Schmidt, H.H., and Stasch, J.P., *NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential*. Nat Rev Drug Discov, 2006. 5(9): p. 755-68.
57. Potter, L.R., *Guanylyl cyclase structure, function and regulation*. Cell Signal, 2011. 23(12): p. 1921-1926.
58. Friebe, A., Sandner, P., and Schmidtko, A., *cGMP: a unique 2nd messenger molecule - recent developments in cGMP research and development*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2020. 393(2): p. 287-302.
59. Wang, H., Zhong, F., Pan, J., Li, W., Su, J., Huang, Z.X., and Tan, X., *Structural and functional insights into the heme-binding domain of the human soluble guanylate cyclase  $\alpha 2$  subunit and heterodimeric  $\alpha 2\beta 1$* . J Biol Inorg Chem, 2012. 17(5): p. 719-30.
60. Childers, K.C. and Garcin, E.D., *Structure/function of the soluble guanylyl cyclase catalytic domain*. Nitric Oxide, 2018. 77: p. 53-64.
61. Horst, B.G. and Marletta, M.A., *Physiological activation and deactivation of soluble guanylate cyclase*. Nitric Oxide, 2018. 77: p. 65-74.
62. Stasch, J.P., Pacher, P., and Evgenov, O.V., *Soluble guanylate cyclase as an emerging therapeutic target in cardiopulmonary disease*. Circulation, 2011. 123(20): p. 2263-73.
63. Hofmann, F., *A concise discussion of the regulatory role of cGMP kinase I in cardiac physiology and pathology*. Basic Res Cardiol, 2018. 113(4): p. 31.

64. Zaccolo, M. and Movsesian, M.A., *cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology*. *Circ Res*, 2007. 100(11): p. 1569-78.
65. Greene, S.J., Gheorghiade, M., Borlaug, B.A., Pieske, B., Vaduganathan, M., Burnett, J.C., Jr., Roessig, L., Stasch, J.-P., Solomon, S.D., Paulus, W.J., and Butler, J., *The cGMP signaling pathway as a therapeutic target in heart failure with preserved ejection fraction*. *J Am Heart Assoc*, 2013. 2(6): p. e000536-e000536.
66. Follmann, M., Griebenow, N., Hahn, M.G., Hartung, I., Mais, F.-J., Mittendorf, J., Schäfer, M., Schirok, H., Stasch, J.-P., Stoll, F., and Straub, A., *The Chemistry and Biology of Soluble Guanylate Cyclase Stimulators and Activators*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013. 52(36): p. 9442-9462.
67. Stasch, J.-P., Becker, E.M., Alonso-Alija, C., Apeler, H., Dembowski, K., Feurer, A., Gerzer, R., Minuth, T., Perzborn, E., Pleiß, U., Schröder, H., Schroeder, W., Stahl, E., Steinke, W., Straub, A., and Schramm, M., *NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase*. *Nature*, 2001. 410(6825): p. 212-215.
68. Sharkovska, Y., Kalk, P., Lawrenz, B., Godes, M., Hoffmann, L.S., Wellkisch, K., Geschka, S., Relle, K., Hocher, B., and Stasch, J.P., *Nitric oxide-independent stimulation of soluble guanylate cyclase reduces organ damage in experimental low-renin and high-renin models*. *J Hypertens*, 2010. 28(8): p. 1666-75.
69. Geschka, S., Kretschmer, A., Sharkovska, Y., Evgenov, O.V., Lawrenz, B., Hucke, A., Hocher, B., and Stasch, J.P., *Soluble guanylate cyclase stimulation prevents fibrotic tissue remodeling and improves survival in salt-sensitive Dahl rats*. *PLoS One*, 2011. 6(7): p. e21853.
70. Methner, C., Buonincontri, G., Hu, C.H., Vujic, A., Kretschmer, A., Sawiak, S., Carpenter, A., Stasch, J.P., and Krieg, T., *Riociguat reduces infarct size and post-infarct heart failure in mouse hearts: insights from MRI/PET imaging*. *PLoS One*, 2013. 8(12): p. e83910.
71. Ott, I.M., Alter, M.L., von Websky, K., Kretschmer, A., Tsuprykov, O., Sharkovska, Y., Krause-Relle, K., Raila, J., Henze, A., Stasch, J.P., and Hocher, B., *Effects of stimulation of soluble guanylate cyclase on diabetic nephropathy in diabetic eNOS knockout mice on top of angiotensin II receptor blockade*. *PLoS One*, 2012. 7(8): p. e42623.
72. Beyer, C., Reich, N., Schindler, S.C., Akhmetshina, A., Dees, C., Tomcik, M., Hirth-Dietrich, C., von Degenfeld, G., Sandner, P., Distler, O., Schett, G., and Distler, J.H., *Stimulation of*

- soluble guanylate cyclase reduces experimental dermal fibrosis*. Ann Rheum Dis, 2012. 71(6): p. 1019-26.
73. Dees, C., Beyer, C., Distler, A., Soare, A., Zhang, Y., Palumbo-Zerr, K., Distler, O., Schett, G., Sandner, P., and Distler, J.H., *Stimulators of soluble guanylate cyclase (sGC) inhibit experimental skin fibrosis of different aetiologies*. Ann Rheum Dis, 2015. 74(8): p. 1621-5.
74. Beyer, C., Zenzmaier, C., Palumbo-Zerr, K., Mancuso, R., Distler, A., Dees, C., Zerr, P., Huang, J., Maier, C., Pachowsky, M.L., Friebe, A., Sandner, P., Distler, O., Schett, G., Berger, P., and Distler, J.H., *Stimulation of the soluble guanylate cyclase (sGC) inhibits fibrosis by blocking non-canonical TGF $\beta$  signalling*. Ann Rheum Dis, 2015. 74(7): p. 1408-16.
75. Sandner, P., *From molecules to patients: exploring the therapeutic role of soluble guanylate cyclase stimulators*. Biol Chem, 2018. 399(7): p. 679-690.
76. Bayes-Genis, A., Liu, P.P., Lanfear, D.E., de Boer, R.A., González, A., Thum, T., Emdin, M., and Januzzi, J.L., *Omics phenotyping in heart failure: the next frontier*. Eur Heart J, 2020. 41(36): p. 3477-3484.
77. Boheler, K.R. and Gundry, R.L., *Cutting edge technologies in cardiovascular research*. J Mol Cell Cardiol, 2020. 142: p. 154.
78. Dong, Z. and Chen, Y., *Transcriptomics: Advances and approaches*. Sci China Life Sci, 2013. 56(10): p. 960-967.
79. Slagle, C.E. and Conlon, F.L., *Emerging Field of Cardiomics: High-Throughput Investigations into Transcriptional Regulation of Cardiovascular Development and Disease*. Trends Genet, 2016. 32(11): p. 707-716.
80. Wirka, R.C., Pjanic, M., and Quertermous, T., *Advances in Transcriptomics*. Circ Res, 2018. 122(9): p. 1200-1220.
81. Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M., *RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics*. Nat Rev Genet, 2009. 10(1): p. 57-63.
82. Chu, Y. and Corey, D.R., *RNA sequencing: platform selection, experimental design, and data interpretation*. Nucleic Acid Ther, 2012. 22(4): p. 271-274.
83. Stark, R., Grzelak, M., and Hadfield, J., *RNA sequencing: the teenage years*. Nat Rev Genet, 2019. 20(11): p. 631-656.
84. Levy, S.E. and Boone, B.E., *Next-Generation Sequencing Strategies*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2019. 9(7): p. a025791.

85. Leinonen, R., Sugawara, H., Shumway, M., and International Nucleotide Sequence Database, C., *The sequence read archive*. *Nucleic Acids Res*, 2011. 39(Database issue): p. D19-D21.
86. Robinson, M.D. and Oshlack, A., *A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data*. *Genome Biol*, 2010. 11(3): p. R25.
87. Dillies, M.A., Rau, A., Aubert, J., Hennequet-Antier, C., Jeanmougin, M., Servant, N., Keime, C., Marot, G., Castel, D., Estelle, J., Guernec, G., Jagla, B., Jouneau, L., Laloë, D., Le Gall, C., Schaëffer, B., Le Crom, S., Guedj, M., and Jaffrézic, F., *A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis*. *Brief Bioinform*, 2013. 14(6): p. 671-83.
88. Wilkins, M.R., Pasquali, C., Appel, R.D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J.-C., Yan, J.X., Gooley, A.A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K.L., and Hochstrasser, D.F., *From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis*. *Bio/Technology*, 1996. 14(1): p. 61-65.
89. Godovac-Zimmermann, J., *8th Siena meeting. From genome to proteome: integration and proteome completion*. *Expert Rev Proteomics*, 2008. 5(6): p. 769-73.
90. Arrell, D.K., Neverova, I., and Van Eyk, J.E., *Cardiovascular proteomics: evolution and potential*. *Circ Res*, 2001. 88(8): p. 763-73.
91. Cox, J. and Mann, M., *Quantitative, High-Resolution Proteomics for Data-Driven Systems Biology*. *Annu Rev Biochem*, 2011. 80(1): p. 273-299.
92. Jungblut, P.R., Holzhütter, H.G., Apweiler, R., and Schlüter, H., *The speciation of the proteome*. *Chem Cent J*, 2008. 2: p. 16.
93. Altelaar, A.F., Munoz, J., and Heck, A.J., *Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics*. *Nat Rev Genet*, 2013. 14(1): p. 35-48.
94. Ang, M.Y., Low, T.Y., Lee, P.Y., Wan Mohamad Nazarie, W.F., Guryev, V., and Jamal, R., *Proteogenomics: From next-generation sequencing (NGS) and mass spectrometry-based proteomics to precision medicine*. *Clin Chim Acta*, 2019. 498: p. 38-46.
95. Görg, A., Weiss, W., and Dunn, M.J., *Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics*. *Proteomics*, 2004. 4(12): p. 3665-85.
96. Dapic, I., Baljeu-Neuman, L., Uwugiaren, N., Kers, J., Goodlett, D.R., and Corthals, G.L., *Proteome analysis of tissues by mass spectrometry*. *Mass Spectrom Rev*, 2019. 38(4-5): p. 403-441.

97. Gregorich, Z.R., Chang, Y.H., and Ge, Y., *Proteomics in heart failure: top-down or bottom-up?* Pflugers Arch, 2014. 466(6): p. 1199-209.
98. Boone, C. and Adamec, J., *10 - Top-Down Proteomics*, in *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry (Second Edition)*, P. Ciborowski and J. Silberring, Editors. 2016, Elsevier: Boston. p. 175-191.
99. Zhu, R., Zacharias, L., Wooding, K.M., Peng, W., and Mechref, Y., *Chapter Twenty-One - Glycoprotein Enrichment Analytical Techniques: Advantages and Disadvantages*, in *Methods in Enzymology*, A.K. Shukla, Editor. 2017, Academic Press. p. 397-429.
100. Pitt, J.J., *Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry*. Clin Biochem Rev, 2009. 30(1): p. 19-34.
101. Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., and Whitehouse, C.M., *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science, 1989. 246(4926): p. 64-71.
102. Gross, J.H., *Massenanalysatoren*, in *Massenspektrometrie: Spektroskopiekurs kompakt*. 2019, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 97-103.
103. Pandey, A. and Mann, M., *Proteomics to study genes and genomes*. Nature, 2000. 405(6788): p. 837-46.
104. Yates, J.R., 3rd, *Mass spectrometry. From genomics to proteomics*. Trends Genet, 2000. 16(1): p. 5-8.
105. Lindemann, C., Thomanek, N., Hundt, F., Lerari, T., Meyer, H.E., Wolters, D., and Marcus, K., *Strategies in relative and absolute quantitative mass spectrometry based proteomics*. Biol Chem, 2017. 398(5-6): p. 687-699.
106. Crick, F., *Central Dogma of Molecular Biology*. Nature, 1970. 227(5258): p. 561-563.
107. Crick, F.H., *On protein synthesis*. Symp Soc Exp Biol, 1958. 12: p. 138-63.
108. Das, S., Shah, R., Dimmeler, S., Freedman, J.E., Holley, C., Lee, J.M., Moore, K., Musunuru, K., Wang, D.Z., Xiao, J., and Yin, K.J., *Noncoding RNAs in Cardiovascular Disease: Current Knowledge, Tools and Technologies for Investigation, and Future Directions: A Scientific Statement From the American Heart Association*. Circ Genom Precis Med, 2020. 13(4): p. e000062.
109. Martinez, S.R., Gay, M.S., and Zhang, L., *Epigenetic mechanisms in heart development and disease*. Drug Discov Today, 2015. 20(7): p. 799-811.
110. Wojciechowska, A., Braniewska, A., and Kozar-Kamińska, K., *MicroRNA in cardiovascular biology and disease*. Adv Clin Exp Med, 2017. 26(5): p. 865-874.
111. Ambros, V., *The functions of animal microRNAs*. Nature, 2004. 431(7006): p. 350-5.

112. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. 116(2): p. 281-97.
113. Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B., and Bartel, D.P., *Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs*. Genome Res, 2009. 19(1): p. 92-105.
114. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., and Peng, C., *Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation*. Front Endocrinol, 2018. 9(402).
115. Treiber, T., Treiber, N., and Meister, G., *Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019. 20(1): p. 5-20.
116. Meijer, H.A., Smith, E.M., and Bushell, M., *Regulation of miRNA strand selection: follow the leader?* Biochem Soc Trans, 2014. 42(4): p. 1135-40.
117. Roberts, J.T. and Borchert, G.M., *Computational Prediction of MicroRNA Target Genes, Target Prediction Databases, and Web Resources*. Methods Mol Biol, 2017. 1617: p. 109-122.
118. Chipman, L.B. and Pasquinelli, A.E., *miRNA Targeting: Growing beyond the Seed*. Trends Genet, 2019. 35(3): p. 215-222.
119. Rüdibusch, J., Benkner, A., Poesch, A., Dörr, M., Völker, U., Grube, K., Hammer, E., and Felix, S.B., *Dynamic adaptation of myocardial proteome during heart failure development*. PLoS One, 2017. 12(10): p. e0185915.
120. Sweat, F., Puchtler, H., and Rosenthal, S.I., *Sirius red F3BA as a stain for connective tissue*. Arch Pathol, 1964. 78: p. 69-72.
121. Junqueira, L.C.U., Bignolas, G., and Brentani, R., *Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections*. Histochem J, 1979. 11(4): p. 447-455.
122. Whittaker, P., Kloner, R., Boughner, D., and Pickering, J., *Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosirius red staining and circularly polarized light*. Basic Res Cardiol, 1994. 89(5): p. 397-410.
123. Maeda, M., Biro, S., Kamogawa, Y., Hirakawa, T., Setoguchi, M., and Tei, C., *Dystrophin upregulation in pressure-overloaded cardiac hypertrophy in rats*. Cell Motil Cytoskeleton, 2003. 55(1): p. 26-35.
124. Wilsbacher, L.D. and Coughlin, S.R., *Analysis of cardiomyocyte development using immunofluorescence in embryonic mouse heart*. J Vis Exp, 2015(97).
125. Hoffman, E.P., Brown Jr, R.H., and Kunkel, L.M., *Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus*. Cell, 1987. 51(6): p. 919-928.

126. Härtig, W. and Fritschy, J.M., *Indirect immunofluorescence of tissues*. e LS, 2001.
127. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. 72: p. 248-54.
128. Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R.A., Olsen, J.V., and Mann, M., *Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment*. J Proteome Res, 2011. 10(4): p. 1794-805.
129. Kil, Y.J., Becker, C., Sandoval, W., Goldberg, D., and Bern, M., *Preview: a program for surveying shotgun proteomics tandem mass spectrometry data*. Anal Chem, 2011. 83(13): p. 5259-67.
130. Cox, J., Hein, M.Y., Lubner, C.A., Paron, I., Nagaraj, N., and Mann, M., *Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ*. Mol Cell Proteomics, 2014. 13(9): p. 2513-26.
131. Tyanova, S., Temu, T., and Cox, J., *The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics*. Nat Protoc, 2016. 11(12): p. 2301-2319.
132. Kramer, A., Green, J., Pollard, J., Jr., and Tugendreich, S., *Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis*. Bioinformatics, 2014. 30(4): p. 523-30.
133. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. 227(5259): p. 680-5.
134. Ladner, C.L., Yang, J., Turner, R.J., and Edwards, R.A., *Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining*. Anal Biochem, 2004. 326(1): p. 13-20.
135. McDonald, K., Choe, J., Elbaggari, A., Zhu, M., and Albuero, A., *In-Gel Protein Quantitation Using the Criterion Stain-Free™ Gel Imaging System*. Bio-Rad Bulletin, 2008. 5782.
136. Gilda, J.E. and Gomes, A.V., *Stain-Free total protein staining is a superior loading control to beta-actin for Western blots*. Anal Biochem, 2013. 440(2): p. 186-8.
137. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J., *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. 76(9): p. 4350-4.
138. Gurtler, A., Kunz, N., Gomolka, M., Hornhardt, S., Friedl, A.A., McDonald, K., Kohn, J.E., and Posch, A., *Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis*. Anal Biochem, 2013. 433(2): p. 105-11.
139. Gilda, J.E. and Gomes, A.V., *Western blotting using in-gel protein labeling as a normalization control: stain-free technology*. Methods Mol Biol, 2015. 1295: p. 381-91.

140. Posch, A., Kohn, J., Oh, K., Hammond, M., and Liu, N., *V3 stain-free workflow for a practical, convenient, and reliable total protein loading control in western blotting*. *J Vis Exp*, 2013(82): p. 50948.
141. Schmidt, T.G. and Skerra, A., *The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment*. *Protein Eng*, 1993. 6(1): p. 109-122.
142. van Rooij, E., *The art of microRNA research*. *Circulation research*, 2011. 108(2): p. 219-234.
143. Hrdlickova, R., Toloue, M., and Tian, B., *RNA-Seq methods for transcriptome analysis*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2017. 8(1).
144. Ansorge, W.J., *Next-generation DNA sequencing techniques*. *N Biotechnol*, 2009. 25(4): p. 195-203.
145. Milton, J., Wu, X., Smith, M., Brennan, J., Barnes, C., Liu, X., and Ruediger, S., *Modified nucleotides*, W.I.P. Organization, Editor. 2004.
146. Ju, J., Kim, D.H., Bi, L., Meng, Q., Bai, X., Li, Z., Li, X., Marma, M.S., Shi, S., and Wu, J., *Four-color DNA sequencing by synthesis using cleavable fluorescent nucleotide reversible terminators*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(52): p. 19635-19640.
147. Bentley, D.R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H.P., Smith, G.P., Milton, J., Brown, C.G., Hall, K.P., Evers, D.J., Barnes, C.L., and Bignell, H.R., *Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry*. *Nature*, 2008. 456(7218): p. 53.
148. ILLUMINA®, *Instructions for preparing libraries using the TruSeq Stranded mRNA workflow*. *TruSeq Stranded mRNA Reference Guide*, 2017. 1000000040498v00(1.4): p. 7-25.
149. ILLUMINA®, *Instructions for preparing libraries using the TruSeq Small RNA Library Prep Kit*. *TruSeq Small RNA Library Prep Kit Reference Guide*, 2016. 15004197v02(1.6): p. 7-24.
150. Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B., *Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data*. *Bioinformatics*, 2014. 30(15): p. 2114-20.
151. Trapnell, C., Pachter, L., and Salzberg, S.L., *TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq*. *Bioinformatics*, 2009. 25(9): p. 1105-11.
152. Pagès, H., Carlson, M., Falcon, S., and Li, N., *AnnotationDbi: Manipulation of SQLite-based annotations in Bioconductor*. 2020(R package version 1.50.0).
153. Love, M.I., Huber, W., and Anders, S., *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2*. *Genome Biol*, 2014. 15(12): p. 550.



154. Chen, Z., Liu, J., Ng, H.K., Nadarajah, S., Kaufman, H.L., Yang, J.Y., and Deng, Y., *Statistical methods on detecting differentially expressed genes for RNA-seq data*. BMC Syst Biol, 2011. 5 Suppl 3(Suppl 3): p. S1.
155. An, J., Lai, J., Lehman, M.L., and Nelson, C.C., *miRDeep\*: an integrated application tool for miRNA identification from RNA sequencing data*. Nucleic Acids Res, 2013. 41(2): p. 727-37.
156. Kozomara, A., Birgaoanu, M., and Griffiths-Jones, S., *miRBase: from microRNA sequences to function*. Nucleic Acids Res, 2018. 47(D1): p. D155-D162.
157. Kehl, T., Kern, F., Backes, C., Fehlmann, T., Stöckel, D., Meese, E., Lenhof, H.P., and Keller, A., *miRPathDB 2.0: a novel release of the miRNA Pathway Dictionary Database*. Nucleic Acids Res, 2020. 48(D1): p. D142-d147.
158. Stöckel, D., Kehl, T., Trampert, P., Schneider, L., Backes, C., Ludwig, N., Gerasch, A., Kaufmann, M., Gessler, M., Graf, N., Meese, E., Keller, A., and Lenhof, H.P., *Multi-omics enrichment analysis using the GeneTrail2 web service*. Bioinformatics, 2016. 32(10): p. 1502-8.
159. He, L. and Hannon, G.J., *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. Nat Rev Genet, 2004. 5(7): p. 522-31.
160. Yerushalmi, G.M., Salmon-Divon, M., Ophir, L., Yung, Y., Baum, M., Coticchio, G., Fadini, R., Mignini-Renzini, M., Dal Canto, M., Machtinger, R., Maman, E., and Hourvitz, A., *Characterization of the miRNA regulators of the human ovulatory cascade*. Sci Rep, 2018. 8(1): p. 15605.
161. Goytain, A. and Ng, T., *NanoString nCounter Technology: High-Throughput RNA Validation*. Methods Mol Biol, 2020. 2079: p. 125-139.
162. Kulkarni, M.M., *Digital multiplexed gene expression analysis using the NanoString nCounter system*. Curr Protoc Mol Biol, 2011. Chapter 25: p. Unit25B.10.
163. NanoString™, *nCounter® Elements™ XT Reagents User Manual*. NANOSTRING USER MANUAL, 2018. LBL-10241-04: p. 13-20.
164. NanoString™, *nCounter® Analysis System User Manual*. NANOSTRING USER MANUAL, 2018. MAN-C0035-07: p. 12-64.
165. NanoString™, *Gene Expression Data Analysis Guidelines*. NANOSTRING TECH NOTES, 2017. MAN-C0011-04.
166. NanoString™, *nSolver™ 4.0 Analysis Software User Manual*. NANOSTRING USER MANUAL, 2018. MAN-C0019-08.

167. Tanai, E. and Frantz, S., *Pathophysiology of Heart Failure*. Compr Physiol, 2015. 6(1): p. 187-214.
168. Nakamura, M. and Sadoshima, J., *Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy*. Nat Rev Cardiol, 2018. 15(7): p. 387-407.
169. Kislinger, T. and Gramolini, A.O., *Proteome analysis of mouse model systems: A tool to model human disease and for the investigation of tissue-specific biology*. J Proteomics, 2010. 73(11): p. 2205-18.
170. Savoji, H., Mohammadi, M.H., Rafatian, N., Toroghi, M.K., Wang, E.Y., Zhao, Y., Korolj, A., Ahadian, S., and Radisic, M., *Cardiovascular disease models: A game changing paradigm in drug discovery and screening*. Biomaterials, 2019. 198: p. 3-26.
171. Masuyama, H., Tsuruda, T., Kato, J., Imamura, T., Asada, Y., Stasch, J.P., Kitamura, K., and Eto, T., *Soluble guanylate cyclase stimulation on cardiovascular remodeling in angiotensin II-induced hypertensive rats*. Hypertension, 2006. 48(5): p. 972-8.
172. Masuyama, H., Tsuruda, T., Sekita, Y., Hatakeyama, K., Imamura, T., Kato, J., Asada, Y., Stasch, J.P., and Kitamura, K., *Pressure-independent effects of pharmacological stimulation of soluble guanylate cyclase on fibrosis in pressure-overloaded rat heart*. Hypertens Res, 2009. 32(7): p. 597-603.
173. Pradhan, K., Sydykov, A., Tian, X., Mamazhakypov, A., Neupane, B., Luitel, H., Weissmann, N., Seeger, W., Grimminger, F., Kretschmer, A., Stasch, J.P., Ghofrani, H.A., and Schermuly, R.T., *Soluble guanylate cyclase stimulator riociguat and phosphodiesterase 5 inhibitor sildenafil ameliorate pulmonary hypertension due to left heart disease in mice*. Int J Cardiol, 2016. 216: p. 85-91.
174. Rai, N., Veeroju, S., Schymura, Y., Janssen, W., Wietelmann, A., Kojonazarov, B., Weissmann, N., Stasch, J.P., Ghofrani, H.A., Seeger, W., Schermuly, R.T., and Novoyatleva, T., *Effect of Riociguat and Sildenafil on Right Heart Remodeling and Function in Pressure Overload Induced Model of Pulmonary Arterial Banding*. Biomed Res Int, 2018. 2018: p. 3293584.
175. Patten, R.D. and Hall-Porter, M.R., *Small animal models of heart failure: development of novel therapies, past and present*. Circ Heart Fail, 2009. 2(2): p. 138-44.
176. Olson, E.N., *A decade of discoveries in cardiac biology*. Nat Med, 2004. 10(5): p. 467-74.
177. McDonagh, T.A., Metra, M., Adamo, M., Gardner, R.S., Baumbach, A., Böhm, M., Burri, H., Butler, J., Čelutkienė, J., Chioncel, O., Cleland, J.G.F., Coats, A.J.S., Crespo-Leiro, M.G., Farmakis, D., Gilard, M., Heymans, S., Hoes, A.W., Jaarsma, T., Jankowska, E.A., Lainscak,

- M., Lam, C.S.P., Lyon, A.R., McMurray, J.J.V., Mebazaa, A., Mindham, R., Muneretto, C., Francesco Piepoli, M., Price, S., Rosano, G.M.C., Ruschitzka, F., Kathrine Skibelund, A., and Group, E.S.D., *2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. Eur Heart J, 2021. 42(36): p. 3599-3726.
178. Murphy, S.P., Ibrahim, N.E., and Januzzi, J.L., Jr, *Heart Failure With Reduced Ejection Fraction: A Review*. JAMA, 2020. 324(5): p. 488-504.
179. Lindsey, M.L., Kassiri, Z., Virag, J.A.I., de Castro Brás, L.E., and Scherrer-Crosbie, M., *Guidelines for measuring cardiac physiology in mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2018. 314(4): p. H733-h752.
180. Chen, J., Hammoudi, N., Benard, L., Ceholski, D.K., Zhang, S., Lebeche, D., and Hajjar, R.J., *The Probability of Inconstancy in Assessment of Cardiac Function Post-Myocardial Infarction in Mice*. Cardiovasc Pharm Open Access, 2016. 5(5).
181. Houser, S.R., Margulies, K.B., Murphy, A.M., Spinale, F.G., Francis, G.S., Prabhu, S.D., Rockman, H.A., Kass, D.A., Molkentin, J.D., Sussman, M.A., and Koch, W.J., *Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association*. Circ Res, 2012. 111(1): p. 131-50.
182. Furihata, T., Kinugawa, S., Takada, S., Fukushima, A., Takahashi, M., Homma, T., Masaki, Y., Tsuda, M., Matsumoto, J., Mizushima, W., Matsushima, S., Yokota, T., and Tsutsui, H., *The experimental model of transition from compensated cardiac hypertrophy to failure created by transverse aortic constriction in mice*. Int J Cardiol Heart Vasc, 2016. 11: p. 24-28.
183. Richards, D.A., Aronovitz, M.J., Calamaras, T.D., Tam, K., Martin, G.L., Liu, P., Bowditch, H.K., Zhang, P., Huggins, G.S., and Blanton, R.M., *Distinct Phenotypes Induced by Three Degrees of Transverse Aortic Constriction in Mice*. Scientific Reports, 2019. 9(1): p. 5844.
184. Segura, A.M., Frazier, O.H., and Buja, L.M., *Fibrosis and heart failure*. Heart Fail Rev, 2014. 19(2): p. 173-85.
185. Fraccarollo, D., Galuppo, P., Motschenbacher, S., Ruetten, H., Schafer, A., and Bauersachs, J., *Soluble guanylyl cyclase activation improves progressive cardiac remodeling and failure after myocardial infarction. Cardioprotection over ACE inhibition*. Basic Res Cardiol, 2014. 109(4): p. 421.

186. Benke, K., Németh, B.T., Sayour, A.A., Stark, K.A., Oláh, A., Ruppert, M., Szabó, G., Korkmaz-Icöz, S., Horváth, E.M., Benkő, R., Hartyánszky, I., Szabolcs, Z., Merkely, B., and Radovits, T., *Stimulation of soluble guanylate cyclase improves donor organ function in rat heart transplantation*. Sci Rep, 2020. 10(1): p. 5358.
187. Irvine, J.C., Ganthavee, V., Love, J.E., Alexander, A.E., Horowitz, J.D., Stasch, J.P., Kemp-Harper, B.K., and Ritchie, R.H., *The soluble guanylyl cyclase activator bay 58-2667 selectively limits cardiomyocyte hypertrophy*. PLoS One, 2012. 7(11): p. e44481.
188. Sandner, P., Zimmer, D.P., Milne, G.T., Follmann, M., Hobbs, A., and Stasch, J.P., *Soluble Guanylate Cyclase Stimulators and Activators*. Handb Exp Pharmacol, 2021. 264: p. 355-394.
189. ILLUMINA®, *Transitioning from Microarrays to mRNA-Seq*. iCommunity NEWSLETTER, 2011(Pub. No. 070-2011-034).
190. Zhao, S., Fung-Leung, W.P., Bittner, A., Ngo, K., and Liu, X., *Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells*. PLoS One, 2014. 9(1): p. e78644.
191. Rao, M.S., Van Vleet, T.R., Ciurlionis, R., Buck, W.R., Mittelstadt, S.W., Blomme, E.A.G., and Liguori, M.J., *Comparison of RNA-Seq and Microarray Gene Expression Platforms for the Toxicogenomic Evaluation of Liver From Short-Term Rat Toxicity Studies*. Front Genet, 2019. 9(636).
192. Zhao, B.S., Roundtree, I.A., and He, C., *Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017. 18(1): p. 31-42.
193. Nachtergaele, S. and He, C., *The emerging biology of RNA post-transcriptional modifications*. RNA biology, 2017. 14(2): p. 156-163.
194. Moyes, C.D. and Schulte, P.M., *Tierphysiologie*. Pearson Studium, 2008. München 2008: p. 379-394.
195. Hinderer, S. and Schenke-Layland, K., *Cardiac fibrosis – A short review of causes and therapeutic strategies*. Adv Drug Deliv Rev, 2019. 146: p. 77-82.
196. Doppler, S.A., Carvalho, C., Lahm, H., Deutsch, M.-A., Dreßen, M., Puluca, N., Lange, R., and Krane, M., *Cardiac fibroblasts: more than mechanical support*. J Thorac Dis, 2017. 9(Suppl 1): p. S36-S51.
197. Weber, K.T., Sun, Y., Tyagi, S.C., and Cleutjens, J.P., *Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms*. J Mol Cell Cardiol, 1994. 26(3): p. 279-92.

198. Nielsen, M.J. and Karsdal, M.A., *Chapter 3 - Type III Collagen*, in *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin*, M.A. Karsdal, Editor. 2016, Academic Press. p. 21-30.
199. Gourdie, R.G., Dimmeler, S., and Kohl, P., *Novel therapeutic strategies targeting fibroblasts and fibrosis in heart disease*. *Nat Rev Drug Discov*, 2016. 15(9): p. 620-638.
200. Lijnen, P.J., Petrov, V.V., and Fagard, R.H., *Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1)*. *Mol Genet Metab*, 2000. 71(1-2): p. 418-35.
201. Hinz, B., Phan, S.H., Thannickal, V.J., Prunotto, M., Desmoulière, A., Varga, J., De Wever, O., Mareel, M., and Gabbiani, G., *Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling*. *Am J Pathol*, 2012. 180(4): p. 1340-1355.
202. Rockey, D.C., Bell, P.D., and Hill, J.A., *Fibrosis--a common pathway to organ injury and failure*. *N Engl J Med*, 2015. 372(12): p. 1138-49.
203. Sandner, P. and Stasch, J.P., *Anti-fibrotic effects of soluble guanylate cyclase stimulators and activators: A review of the preclinical evidence*. *Respir Med*, 2017. 122 Suppl 1: p. S1-s9.
204. Chu, A.J. and Prasad, J.K., *Up-regulation by human recombinant transforming growth factor beta-1 of collagen production in cultured dermal fibroblasts is mediated by the inhibition of nitric oxide signaling*. *J Am Coll Surg*, 1999. 188(3): p. 271-80.
205. Lambers, C., Roth, M., Hofbauer, E., Petkov, V., and Block, L.-H., *Anti-remodeling potencies of the soluble guanylate cyclase activator BAY 41-2272 in human lung fibroblasts*. *Eur Respir J*, 2014. 44(Suppl 58): p. 3423.
206. Hewitson, T.D., Martic, M., Darby, I.A., Kelynack, K.J., Bisucci, T., Tait, M.G., and Becker, G.J., *Intracellular cyclic nucleotide analogues inhibit in vitro mitogenesis and activation of fibroblasts derived from obstructed rat kidneys*. *Nephron Exp Nephrol*, 2004. 96(2): p. e59-66.
207. Dunkern, T.R., Feurstein, D., Rossi, G.A., Sabatini, F., and Hatzelmann, A., *Inhibition of TGF-beta induced lung fibroblast to myofibroblast conversion by phosphodiesterase inhibiting drugs and activators of soluble guanylyl cyclase*. *Eur J Pharmacol*, 2007. 572(1): p. 12-22.
208. Zenzmaier, C., Kern, J., Heitz, M., Plas, E., Zwerschke, W., Mattesich, M., Sandner, P., and Berger, P., *Activators and stimulators of soluble guanylate cyclase counteract myofibroblast differentiation of prostatic and dermal stromal cells*. *Exp Cell Res*, 2015. 338(2): p. 162-9.
209. Zeisberg, E.M., Tarnavski, O., Zeisberg, M., Dorfman, A.L., McMullen, J.R., Gustafsson, E., Chandraker, A., Yuan, X., Pu, W.T., Roberts, A.B., Neilson, E.G., Sayegh, M.H., Izumo, S.,

- and Kalluri, R., *Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis*. Nat Med, 2007. 13(8): p. 952-61.
210. Ahluwalia, A., Foster, P., Scotland, R.S., McLean, P.G., Mathur, A., Perretti, M., Moncada, S., and Hobbs, A.J., *Antiinflammatory activity of soluble guanylate cyclase: cGMP-dependent down-regulation of P-selectin expression and leukocyte recruitment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(5): p. 1386-91.
211. Nicoletti, A. and Michel, J.B., *Cardiac fibrosis and inflammation: interaction with hemodynamic and hormonal factors*. Cardiovasc Res, 1999. 41(3): p. 532-43.
212. Kuwahara, F., Kai, H., Tokuda, K., Takeya, M., Takeshita, A., Egashira, K., and Imaizumi, T., *Hypertensive myocardial fibrosis and diastolic dysfunction: another model of inflammation?* Hypertension, 2004. 43(4): p. 739-45.
213. Graf, K., *Die Pathophysiologie der linksventrikulären Hypertrophie*, in *Bedeutung der Zell-Matrix-Interaktion für die linksventrikuläre Hypertrophie*, K. Graf, Editor. 2000, Steinkopff: Heidelberg. p. 6-9.
214. Barry, S.P., Davidson, S.M., and Townsend, P.A., *Molecular regulation of cardiac hypertrophy*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. 40(10): p. 2023-2039.
215. Maisel, A., Mueller, C., Adams, K., Jr., Anker, S.D., Aspromonte, N., Cleland, J.G., Cohen-Solal, A., Dahlstrom, U., DeMaria, A., Di Somma, S., Filippatos, G.S., Fonarow, G.C., Jourdain, P., Komajda, M., Liu, P.P., McDonagh, T., McDonald, K., Mebazaa, A., Nieminen, M.S., Peacock, W.F., Tubaro, M., Valle, R., Vanderhyden, M., Yancy, C.W., Zannad, F., and Braunwald, E., *State of the art: using natriuretic peptide levels in clinical practice*. Eur J Heart Fail, 2008. 10(9): p. 824-39.
216. Nishikimi, T., Maeda, N., and Matsuoka, H., *The role of natriuretic peptides in cardioprotection*. Cardiovasc Res, 2006. 69(2): p. 318-28.
217. Mori, T., Chen, Y.F., Feng, J.A., Hayashi, T., Oparil, S., and Perry, G.J., *Volume overload results in exaggerated cardiac hypertrophy in the atrial natriuretic peptide knockout mouse*. Cardiovasc Res, 2004. 61(4): p. 771-9.
218. Wang, D., Oparil, S., Feng, J.A., Li, P., Perry, G., Chen, L.B., Dai, M., John, S.W., and Chen, Y.F., *Effects of pressure overload on extracellular matrix expression in the heart of the atrial natriuretic peptide-null mouse*. Hypertension, 2003. 42(1): p. 88-95.
219. Tamura, N., Ogawa, Y., Chusho, H., Nakamura, K., Nakao, K., Suda, M., Kasahara, M., Hashimoto, R., Katsuura, G., Mukoyama, M., Itoh, H., Saito, Y., Tanaka, I., Otani, H., and

- Katsuki, M., *Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(8): p. 4239-44.
220. Gardner, D.G., Chen, S., Glenn, D.J., and Grigsby, C.L., *Molecular biology of the natriuretic peptide system: implications for physiology and hypertension*. Hypertension, 2007. 49(3): p. 419-26.
221. Kuhn, M., Voss, M., Mitko, D., Stypmann, J., Schmid, C., Kawaguchi, N., Grabellus, F., and Baba, H.A., *Left ventricular assist device support reverses altered cardiac expression and function of natriuretic peptides and receptors in end-stage heart failure*. Cardiovasc Res, 2004. 64(2): p. 308-14.
222. Lompre, A.M., Nadal-Ginard, B., and Mahdavi, V., *Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated*. J Biol Chem, 1984. 259(10): p. 6437-46.
223. Ling, S.S.M., Chen, Y.T., Wang, J., Richards, A.M., and Liew, O.W., *Ankyrin Repeat Domain 1 Protein: A Functionally Pleiotropic Protein with Cardiac Biomarker Potential*. Int J Mol Sci, 2017. 18(7).
224. Kranias, E.G. and Hajjar, R.J., *Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome*. Circ Res, 2012. 110(12): p. 1646-60.
225. Luo, W., Grupp, I.L., Harrer, J., Ponniah, S., Grupp, G., Duffy, J.J., Doetschman, T., and Kranias, E.G., *Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation*. Circ Res, 1994. 75(3): p. 401-9.
226. Chu, G., Kerr, J.P., Mitton, B., Egnaczyk, G.F., Vazquez, J.A., Shen, M., Kilby, G.W., Stevenson, T.I., Maggio, J.E., Vockley, J., Rapundalo, S.T., and Kranias, E.G., *Proteomic analysis of hyperdynamic mouse hearts with enhanced sarcoplasmic reticulum calcium cycling*. FASEB J, 2004. 18(14): p. 1725-1727.
227. Huss, J.M. and Kelly, D.P., *Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance*. J Clin Invest, 2005. 115(3): p. 547-55.
228. Bertero, E. and Maack, C., *Metabolic remodelling in heart failure*. Nat Rev Cardiol, 2018. 15(8): p. 457-470.
229. Roe, N.D. and Ren, J., *Nitric oxide synthase uncoupling: a therapeutic target in cardiovascular diseases*. Vascul Pharmacol, 2012. 57(5-6): p. 168-72.

230. Schwarzer, M., Osterholt, M., Lunkenbein, A., Schrepper, A., Amorim, P., and Doenst, T., *Mitochondrial reactive oxygen species production and respiratory complex activity in rats with pressure overload-induced heart failure*. J Physiol, 2014. 592(17): p. 3767-3782.
231. Karbach, S., Wenzel, P., Waisman, A., Munzel, T., and Daiber, A., *eNOS uncoupling in cardiovascular diseases--the role of oxidative stress and inflammation*. Curr Pharm Des, 2014. 20(22): p. 3579-94.
232. Gerassimou, C., Kotanidou, A., Zhou, Z., Simoes, D.C., Roussos, C., and Papapetropoulos, A., *Regulation of the expression of soluble guanylyl cyclase by reactive oxygen species*. Br J Pharmacol, 2007. 150(8): p. 1084-91.
233. Emdin, M., Aimo, A., Castiglione, V., Vergaro, G., Georgiopoulos, G., Saccaro, L.F., Lombardi, C.M., Passino, C., Cerbai, E., Metra, M., and Senni, M., *Targeting Cyclic Guanosine Monophosphate to Treat Heart Failure: JACC Review Topic of the Week*. J Am Coll Cardiol, 2020. 76(15): p. 1795-1807.
234. Koliijn, D., Kovács, Á., Herwig, M., Lódi, M., Sieme, M., Alhaj, A., Sandner, P., Papp, Z., Reusch, P.H., Haldenwang, P., Falcão-Pires, I., Linke, W.A., Jaquet, K., Van Linthout, S., Mügge, A., Tschöpe, C., and Hamdani, N., *Enhanced Cardiomyocyte Function in Hypertensive Rats With Diastolic Dysfunction and Human Heart Failure Patients After Acute Treatment With Soluble Guanylyl Cyclase (sGC) Activator*. Front Physiol, 2020. 11: p. 345.
235. Salloum, F.N., Das, A., Samidurai, A., Hoke, N.N., Chau, V.Q., Ockaili, R.A., Stasch, J.P., and Kukreja, R.C., *Cinaciguat, a novel activator of soluble guanylate cyclase, protects against ischemia/reperfusion injury: role of hydrogen sulfide*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. 302(6): p. H1347-54.
236. Gong, W., Yan, M., Chen, J., Chaugai, S., Chen, C., and Wang, D., *Chronic inhibition of cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase 5 prevented cardiac fibrosis through inhibition of transforming growth factor  $\beta$ -induced Smad signaling*. Front Med, 2014. 8(4): p. 445-55.
237. Methner, C., Lukowski, R., Grube, K., Loga, F., Smith, R.A., Murphy, M.P., Hofmann, F., and Krieg, T., *Protection through postconditioning or a mitochondria-targeted S-nitrosothiol is unaffected by cardiomyocyte-selective ablation of protein kinase G*. Basic Res Cardiol, 2013. 108(2): p. 337.
238. Blanton, R.M., Takimoto, E., Lane, A.M., Aronovitz, M., Piotrowski, R., Karas, R.H., Kass, D.A., and Mendelsohn, M.E., *Protein kinase g ia inhibits pressure overload-induced cardiac*



- remodeling and is required for the cardioprotective effect of sildenafil in vivo.* J Am Heart Assoc, 2012. 1(5): p. e003731.
239. Nagayama, T., Hsu, S., Zhang, M., Koitabashi, N., Bedja, D., Gabrielson, K.L., Takimoto, E., and Kass, D.A., *Sildenafil stops progressive chamber, cellular, and molecular remodeling and improves calcium handling and function in hearts with pre-existing advanced hypertrophy caused by pressure overload.* J Am Coll Cardiol, 2009. 53(2): p. 207-15.
240. Menges, L., Krawutschke, C., Füchtbauer, E.M., Füchtbauer, A., Sandner, P., Koesling, D., and Russwurm, M., *Mind the gap (junction): cGMP induced by nitric oxide in cardiac myocytes originates from cardiac fibroblasts.* Br J Pharmacol, 2019. 176(24): p. 4696-4707.
241. Bork, N.I., Molina, C.E., and Nikolaev, V.O., *cGMP signalling in cardiomyocyte microdomains.* Biochem Soc Trans, 2019. 47(5): p. 1327-1339.
242. Frankenreiter, S., Bednarczyk, P., Kniess, A., Bork, N.I., Straubinger, J., Koprowski, P., Wrzosek, A., Mohr, E., Logan, A., Murphy, M.P., Gawaz, M., Krieg, T., Szewczyk, A., Nikolaev, V.O., Ruth, P., and Lukowski, R., *cGMP-Elevating Compounds and Ischemic Conditioning Provide Cardioprotection Against Ischemia and Reperfusion Injury via Cardiomyocyte-Specific BK Channels.* Circulation, 2017. 136(24): p. 2337-2355.
243. Lukowski, R., Rybalkin, S.D., Loga, F., Leiss, V., Beavo, J.A., and Hofmann, F., *Cardiac hypertrophy is not amplified by deletion of cGMP-dependent protein kinase I in cardiomyocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(12): p. 5646-51.
244. Haider, S. and Pal, R., *Integrated analysis of transcriptomic and proteomic data.* Curr Genomics, 2013. 14(2): p. 91-110.
245. Edfors, F., Danielsson, F., Hallström, B.M., Käll, L., Lundberg, E., Pontén, F., Forsström, B., and Uhlén, M., *Gene-specific correlation of RNA and protein levels in human cells and tissues.* Mol Syst Biol, 2016. 12(10): p. 883.
246. Wilhelm, M., Schlegl, J., Hahne, H., Gholami, A.M., Lieberenz, M., Savitski, M.M., Ziegler, E., Butzmann, L., Gessulat, S., Marx, H., Mathieson, T., Lemeer, S., Schnatbaum, K., Reimer, U., Wenschuh, H., Mollenhauer, M., Slotta-Huspenina, J., Boese, J.H., Bantscheff, M., Gerstmair, A., Faerber, F., and Kuster, B., *Mass-spectrometry-based draft of the human proteome.* Nature, 2014. 509(7502): p. 582-7.
247. Lindeboom, R.G., van Voorthuijsen, L., Oost, K.C., Rodríguez-Colman, M.J., Luna-Velez, M.V., Furlan, C., Baraille, F., Jansen, P.W., Ribeiro, A., Burgering, B.M., Snippert, H.J., and Vermeulen, M., *Integrative multi-omics analysis of intestinal organoid differentiation.* Mol Syst Biol, 2018. 14(6): p. e8227.

248. Liu, Y., Beyer, A., and Aebersold, R., *On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance*. Cell, 2016. 165(3): p. 535-50.
249. Akoglu, H., *User's guide to correlation coefficients*. Turk J Emerg Med, 2018. 18(3): p. 91-93.
250. Ghazalpour, A., Bennett, B., Petyuk, V.A., Orozco, L., Hagopian, R., Mungrue, I.N., Farber, C.R., Sinsheimer, J., Kang, H.M., Furlotte, N., Park, C.C., Wen, P.Z., Brewer, H., Weitz, K., Camp, D.G., 2nd, Pan, C., Yordanova, R., Neuhaus, I., Tilford, C., Siemers, N., Gargalovic, P., Eskin, E., Kirchgessner, T., Smith, D.J., Smith, R.D., and Lusk, A.J., *Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse*. PLoS Genet, 2011. 7(6): p. e1001393.
251. Manzoni, C., Kia, D.A., Vandrovicova, J., Hardy, J., Wood, N.W., Lewis, P.A., and Ferrari, R., *Genome, transcriptome and proteome: the rise of omics data and their integration in biomedical sciences*. Brief Bioinform, 2016. 19(2): p. 286-302.
252. Bartel, D.P., *MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions*. Cell, 2009. 136(2): p. 215-233.
253. Williams, A.E., *Functional aspects of animal microRNAs*. Cell Mol Life Sci, 2008. 65(4): p. 545-62.
254. Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., and Bartel, D.P., *Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels*. Nature, 2010. 466(7308): p. 835-840.
255. Iwakawa, H.-o. and Tomari, Y., *The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression*. Trends Cell Biol, 2015. 25(11): p. 651-665.
256. Colpaert, R.M.W. and Calore, M., *MicroRNAs in Cardiac Diseases*. Cells, 2019. 8(7).
257. Myagmar, B.E., Flynn, J.M., Cowley, P.M., Swigart, P.M., Montgomery, M.D., Thai, K., Nair, D., Gupta, R., Deng, D.X., Hosoda, C., Melov, S., Baker, A.J., and Simpson, P.C., *Adrenergic Receptors in Individual Ventricular Myocytes: The Beta-1 and Alpha-1B Are in All Cells, the Alpha-1A Is in a Subpopulation, and the Beta-2 and Beta-3 Are Mostly Absent*. Circ Res, 2017. 120(7): p. 1103-1115.
258. Lympopoulos, A., Rengo, G., and Koch, W.J., *Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy*. Circ Res, 2013. 113(6): p. 739-53.
259. Tuttolomondo, A., Simonetta, I., and Pinto, A., *MicroRNA and receptor mediated signaling pathways as potential therapeutic targets in heart failure*. Expert Opin Ther Targets, 2016. 20(11): p. 1287-1300.

260. de Lucia, C., Eguchi, A., and Koch, W.J., *New Insights in Cardiac  $\beta$ -Adrenergic Signaling During Heart Failure and Aging*. Front Pharmacol, 2018. 9: p. 904.
261. Hou, Y., Sun, Y., Shan, H., Li, X., Zhang, M., Zhou, X., Xing, S., Sun, H., Chu, W., Qiao, G., and Lu, Y.,  *$\beta$ -adrenoceptor regulates miRNA expression in rat heart*. Med Sci Monit, 2012. 18(8): p. Br309-314.
262. Park, K.M., Teoh, J.P., Wang, Y., Broskova, Z., Bayoumi, A.S., Tang, Y., Su, H., Weintraub, N.L., and Kim, I.M., *Carvedilol-responsive microRNAs, miR-199a-3p and -214 protect cardiomyocytes from simulated ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016. 311(2): p. H371-83.
263. Castaldi, A., Zaglia, T., Di Mauro, V., Carullo, P., Viggiani, G., Borile, G., Di Stefano, B., Schiattarella, G.G., Gualazzi, M.G., Elia, L., Stirparo, G.G., Colorito, M.L., Pironti, G., Kunderfranco, P., Esposito, G., Bang, M.L., Mongillo, M., Condorelli, G., and Catalucci, D., *MicroRNA-133 modulates the  $\beta$ 1-adrenergic receptor transduction cascade*. Circ Res, 2014. 115(2): p. 273-83.
264. Besser, J., Malan, D., Wystub, K., Bachmann, A., Wietelmann, A., Sasse, P., Fleischmann, B.K., Braun, T., and Boettger, T., *MiRNA-1/133a clusters regulate adrenergic control of cardiac repolarization*. PLoS One, 2014. 9(11): p. e113449.
265. Roca-Alonso, L., Castellano, L., Mills, A., Dabrowska, A.F., Sikkil, M.B., Pellegrino, L., Jacob, J., Frampton, A.E., Krell, J., Coombes, R.C., Harding, S.E., Lyon, A.R., and Stebbing, J., *Myocardial MiR-30 downregulation triggered by doxorubicin drives alterations in  $\beta$ -adrenergic signaling and enhances apoptosis*. Cell Death Dis, 2015. 6(5): p. e1754-e1754.
266. Liu, Z., Tao, B., Fan, S., Cui, S., Pu, Y., Qiu, L., Xia, H., and Xu, L., *Over-expression of microRNA-145 drives alterations in  $\beta$ -adrenergic signaling and attenuates cardiac remodeling in heart failure post myocardial infarction*. Aging (Albany NY), 2020. 12(12): p. 11603-11622.
267. van Rooij, E., Marshall, W.S., and Olson, E.N., *Toward microRNA-based therapeutics for heart disease: the sense in antisense*. Circ Res, 2008. 103(9): p. 919-28.
268. Wang, H. and Cai, J., *The role of microRNAs in heart failure*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017. 1863(8): p. 2019-2030.
269. Xue, J., Zhou, D., Poulsen, O., Hartley, I., Imamura, T., Xie, E.X., and Haddad, G.G., *Exploring miRNA-mRNA regulatory network in cardiac pathology in Na(+)/H(+) exchanger isoform 1 transgenic mice*. Physiol Genomics, 2018. 50(10): p. 846-861.

270. Matkovich, S.J. and Dorn, G.W., 2nd, *Deep sequencing of cardiac microRNA-mRNA interactomes in clinical and experimental cardiomyopathy*. *Methods Mol Biol*, 2015. 1299: p. 27-49.
271. Vacchi-Suzzi, C., Hahne, F., Scheubel, P., Marcellin, M., Dubost, V., Westphal, M., Boeglen, C., Büchmann-Møller, S., Cheung, M.S., Cordier, A., De Benedetto, C., Deurinck, M., Frei, M., Moulin, P., Oakeley, E., Grenet, O., Grevot, A., Stull, R., Theil, D., Moggs, J.G., Marrer, E., and Couttet, P., *Heart structure-specific transcriptomic atlas reveals conserved microRNA-mRNA interactions*. *PLoS One*, 2013. 8(1): p. e52442.
272. Zhang, S., Li, Q., Liu, J., and Zhou, X.J., *A novel computational framework for simultaneous integration of multiple types of genomic data to identify microRNA-gene regulatory modules*. *Bioinformatics*, 2011. 27(13): p. i401-9.
273. Kendrick, N., *A gene's mRNA level does not usually predict its protein level*. <https://kendricklabs.com/white-papers/>, 2014.
274. Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., and Selbach, M., *Global quantification of mammalian gene expression control*. *Nature*, 2011. 473(7347): p. 337-342.
275. Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F.D., Gygi, S.P., and Bartel, D.P., *The impact of microRNAs on protein output*. *Nature*, 2008. 455(7209): p. 64-71.
276. Kalampogias, A., Siasos, G., Oikonomou, E., Mourouzis, K., Bletsas, E., Stampouloglou, P.K., Katsianos, E., Vlasis, K., Marinou, G., Charalambous, G., Vavouranakis, M., and Tousoulis, D., *MicroRNAs in the Management of Heart Failure*. *Curr Med Chem*, 2021.
277. Wang, J., Liew, O.W., Richards, A.M., and Chen, Y.T., *Overview of MicroRNAs in Cardiac Hypertrophy, Fibrosis, and Apoptosis*. *Int J Mol Sci*, 2016. 17(5).
278. Chistiakov, D.A., Orekhov, A.N., and Bobryshev, Y.V., *Cardiac-specific miRNA in cardiogenesis, heart function, and cardiac pathology (with focus on myocardial infarction)*. *J Mol Cell Cardiol*, 2016. 94: p. 107-121.
279. Wang, J., Song, Y., Zhang, Y., Xiao, H., Sun, Q., Hou, N., Guo, S., Wang, Y., Fan, K., Zhan, D., Zha, L., Cao, Y., Li, Z., Cheng, X., Zhang, Y., and Yang, X., *Cardiomyocyte overexpression of miR-27b induces cardiac hypertrophy and dysfunction in mice*. *Cell Res*, 2012. 22(3): p. 516-27.
280. Pinti, M.V., Hathaway, Q.A., and Hollander, J.M., *Role of microRNA in metabolic shift during heart failure*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017. 312(1): p. H33-h45.

281. el Azzouzi, H., Leptidis, S., Dirkx, E., Hoeks, J., van Bree, B., Brand, K., McClellan, E.A., Poels, E., Sluimer, J.C., van den Hoogenhof, M.M., Armand, A.S., Yin, X., Langley, S., Bourajjaj, M., Olieslagers, S., Krishnan, J., Vooijs, M., Kurihara, H., Stubbs, A., Pinto, Y.M., Krek, W., Mayr, M., da Costa Martins, P.A., Schrauwen, P., and De Windt, L.J., *The hypoxia-inducible microRNA cluster miR-199a~214 targets myocardial PPAR $\delta$  and impairs mitochondrial fatty acid oxidation*. Cell Metab, 2013. 18(3): p. 341-54.
282. Callis, T.E., Pandya, K., Seok, H.Y., Tang, R.H., Tatsuguchi, M., Huang, Z.P., Chen, J.F., Deng, Z., Gunn, B., Shumate, J., Willis, M.S., Selzman, C.H., and Wang, D.Z., *MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice*. J Clin Invest, 2009. 119(9): p. 2772-86.
283. van Rooij, E., Quiat, D., Johnson, B.A., Sutherland, L.B., Qi, X., Richardson, J.A., Kelm, R.J., Jr., and Olson, E.N., *A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance*. Dev Cell, 2009. 17(5): p. 662-73.
284. Zhou, Q., Schötterl, S., Backes, D., Brunner, E., Hahn, J.K., Ionesi, E., Aidery, P., Sticht, C., Labeit, S., Kandolf, R., Gawaz, M., and Gramlich, M., *Inhibition of miR-208b improves cardiac function in titin-based dilated cardiomyopathy*. Int J Cardiol, 2017. 230: p. 634-641.
285. McCarthy, J.J., *The MyomiR network in skeletal muscle plasticity*. Exerc Sport Sci Rev, 2011. 39(3): p. 150-4.
286. McCarthy, J.J., Esser, K.A., Peterson, C.A., and Dupont-Versteegden, E.E., *Evidence of MyomiR network regulation of beta-myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle atrophy*. Physiol Genomics, 2009. 39(3): p. 219-26.
287. Soller, K.J., Yang, J., Veglia, G., and Bowser, M.T., *Reversal of Phospholamban Inhibition of the Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca $^{2+}$ -ATPase (SERCA) Using Short, Protein-interacting RNAs and Oligonucleotide Analogs*. J Biol Chem, 2016. 291(41): p. 21510-21518.
288. Shimura, M., Minamisawa, S., Takeshima, H., Jiao, Q., Bai, Y., Umemura, S., and Ishikawa, Y., *Sarcolumenin alleviates stress-induced cardiac dysfunction by improving Ca $^{2+}$  handling of the sarcoplasmic reticulum*. Cardiovasc Res, 2007. 77(2): p. 362-370.
289. Song, R., Hu, X.Q., and Zhang, L., *Mitochondrial MiRNA in Cardiovascular Function and Disease*. Cells, 2019. 8(12).
290. Yang, S., Banerjee, S., Freitas, A.d., Cui, H., Xie, N., Abraham, E., and Liu, G., *miR-21 regulates chronic hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012. 302(6): p. L521-L529.

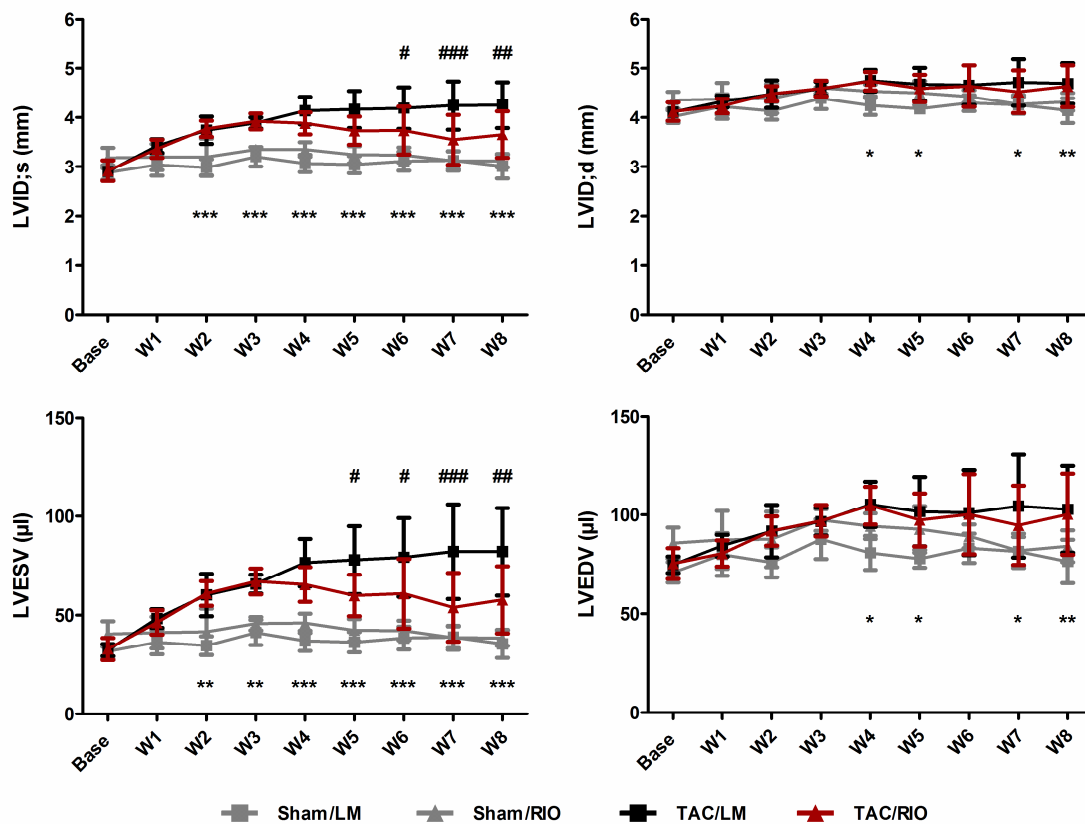
291. Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D.P., Burge, C.B., Carrington, J.C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., Matzke, M., Ruvkun, G., and Tuschl, T., *A uniform system for microRNA annotation*. RNA, 2003. 9(3): p. 277-9.
292. Wang, J., Huang, W., Xu, R., Nie, Y., Cao, X., Meng, J., Xu, X., Hu, S., and Zheng, Z., *MicroRNA-24 regulates cardiac fibrosis after myocardial infarction*. J Cell Mol Med, 2012. 16(9): p. 2150-60.
293. Sun, Y., Wang, H., Li, Y., Liu, S., Chen, J., and Ying, H., *miR-24 and miR-122 Negatively Regulate the Transforming Growth Factor- $\beta$ /Smad Signaling Pathway in Skeletal Muscle Fibrosis*. Mol Ther Nucleic Acids, 2018. 11: p. 528-537.
294. Pottier, N., Cauffiez, C., Perrais, M., Barbry, P., and Mari, B., *FibromiRs: translating molecular discoveries into new anti-fibrotic drugs*. Trends Pharmacol Sci, 2014. 35(3): p. 119-26.
295. Rüdebusch, J., Benkner, A., Nath, N., Fleuch, L., Kaderali, L., Grube, K., Klingel, K., Eckstein, G., Meitinger, T., Fielitz, J., and Felix, S.B., *Stimulation of soluble guanylyl cyclase (sGC) by riociguat attenuates heart failure and pathological cardiac remodelling*. Br J Pharmacol, 2020.
296. Benkner, A., Rüdebusch, J., Nath, N., Hammer, E., Grube, K., Gross, S., Dhople, V.M., Eckstein, G., Meitinger, T., Kaderali, L., Völker, U., Fielitz, J., and Felix, S.B., *Riociguat attenuates left ventricular proteome and microRNA profile changes after experimental aortic stenosis in mice*. (Submitted and under revision in Br J Pharmacol, October 2021).
297. Zheng, X., Zheng, W., Xiong, B., and Huang, J., *The efficacy and safety of soluble guanylate cyclase stimulators in patients with heart failure: A systematic review and meta-analysis*. Medicine (Baltimore), 2018. 97(41): p. e12709.
298. Frey, R., Mück, W., Unger, S., Artmeier-Brandt, U., Weimann, G., and Wensing, G., *Single-dose pharmacokinetics, pharmacodynamics, tolerability, and safety of the soluble guanylate cyclase stimulator BAY 63-2521: an ascending-dose study in healthy male volunteers*. J Clin Pharmacol, 2008. 48(8): p. 926-34.
299. Ghofrani, H.A., Grimminger, F., Grünig, E., Huang, Y., Jansa, P., Jing, Z.C., Kilpatrick, D., Langleben, D., Rosenkranz, S., Menezes, F., Fritsch, A., Nikkho, S., and Humbert, M., *Predictors of long-term outcomes in patients treated with riociguat for pulmonary arterial hypertension: data from the PATENT-2 open-label, randomised, long-term extension trial*. Lancet Respir Med, 2016. 4(5): p. 361-71.

300. Simonneau, G., D'Armini, A.M., Ghofrani, H.A., Grimminger, F., Jansa, P., Kim, N.H., Mayer, E., Pulido, T., Wang, C., Colorado, P., Fritsch, A., Meier, C., Nikkho, S., and Hoeper, M.M., *Predictors of long-term outcomes in patients treated with riociguat for chronic thromboembolic pulmonary hypertension: data from the CHEST-2 open-label, randomised, long-term extension trial*. *Lancet Respir Med*, 2016. 4(5): p. 372-80.
301. Ghofrani, H.A., Galiè, N., Grimminger, F., Grünig, E., Humbert, M., Jing, Z.C., Keogh, A.M., Langleben, D., Kilama, M.O., Fritsch, A., Neuser, D., and Rubin, L.J., *Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension*. *N Engl J Med*, 2013. 369(4): p. 330-40.
302. Ghofrani, H.A., D'Armini, A.M., Grimminger, F., Hoeper, M.M., Jansa, P., Kim, N.H., Mayer, E., Simonneau, G., Wilkins, M.R., Fritsch, A., Neuser, D., Weimann, G., and Wang, C., *Riociguat for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension*. *N Engl J Med*, 2013. 369(4): p. 319-29.
303. Harris, P. and Kuppurao, L., *Quantitative Doppler echocardiography*. *BJA Educ*, 2016. 16(2): p. 46-52.
304. Lee, J., Hyeon, D.Y., and Hwang, D., *Single-cell multiomics: technologies and data analysis methods*. *Exp Mol Med*, 2020. 52(9): p. 1428-1442.
305. Afify, A.Y., *A miRNA's insight into the regenerating heart: a concise descriptive analysis*. *Heart Fail Rev*, 2020. 25(6): p. 1047-1061.
306. Alberti, C., Manzenreither, R.A., Sowemimo, I., Burkard, T.R., Wang, J., Mahofsky, K., Ameres, S.L., and Cochella, L., *Cell-type specific sequencing of microRNAs from complex animal tissues*. *Nat Methods*, 2018. 15(4): p. 283-289.
307. Klinger, J.R., Chakinala, M.M., Langleben, D., Rosenkranz, S., and Sitbon, O., *Riociguat: Clinical research and evolving role in therapy*. *Br J Clin Pharmacol*, 2020.
308. Traynor, K., *Riociguat approved for pulmonary hypertension*. *Am J Health Syst Pharm*, 2013. 70(22): p. 1960.
309. EMA, *CHMP assessment report - Adempas - International non-proprietary name: riociguat*, in *EUROPEAN MEDICINES AGENCY - SCIENCE MEDICINES HEALTH*. 2014.
310. Armstrong, P.W., Roessig, L., Patel, M.J., Anstrom, K.J., Butler, J., Voors, A.A., Lam, C.S.P., Ponikowski, P., Temple, T., Pieske, B., Ezekowitz, J., Hernandez, A.F., Koglin, J., and O'Connor, C.M., *A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of the Efficacy and Safety of the Oral Soluble Guanylate Cyclase Stimulator: The VICTORIA Trial*. *JACC Heart Fail*, 2018. 6(2): p. 96-104.

311. Gheorghide, M., Greene, S.J., Butler, J., Filippatos, G., Lam, C.S., Maggioni, A.P., Ponikowski, P., Shah, S.J., Solomon, S.D., Kraigher-Krainer, E., Samano, E.T., Müller, K., Roessig, L., and Pieske, B., *Effect of Vericiguat, a Soluble Guanylate Cyclase Stimulator, on Natriuretic Peptide Levels in Patients With Worsening Chronic Heart Failure and Reduced Ejection Fraction: The SOCRATES-REDUCED Randomized Trial*. JAMA, 2015. 314(21): p. 2251-62.
312. Pieske, B., Butler, J., Filippatos, G., Lam, C., Maggioni, A.P., Ponikowski, P., Shah, S., Solomon, S., Kraigher-Krainer, E., Samano, E.T., Scalise, A.V., Müller, K., Roessig, L., and Gheorghide, M., *Rationale and design of the SOLuble guanylate Cyclase stimuloR in heArT failurE Studies (SOCRATES)*. Eur J Heart Fail, 2014. 16(9): p. 1026-38.
313. Bonderman, D., Ghio, S., Felix, S.B., Ghofrani, H.A., Michelakis, E., Mitrovic, V., Oudiz, R.J., Boateng, F., Scalise, A.V., Roessig, L., and Semigran, M.J., *Riociguat for patients with pulmonary hypertension caused by systolic left ventricular dysfunction: a phase IIb double-blind, randomized, placebo-controlled, dose-ranging hemodynamic study*. Circulation, 2013. 128(5): p. 502-11.
314. Ghio, S., Bonderman, D., Felix, S.B., Ghofrani, H.A., Michelakis, E.D., Mitrovic, V., Oudiz, R.J., Frey, R., Roessig, L., and Semigran, M.J., *Left ventricular systolic dysfunction associated with pulmonary hypertension riociguat trial (LEPHT): rationale and design*. Eur J Heart Fail, 2012. 14(8): p. 946-53.
315. Frey, R., Becker, C., Saleh, S., Unger, S., van der Mey, D., and Mück, W., *Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile of Riociguat*. Clin Pharmacokinet, 2018. 57(6): p. 647-661.
316. Markham, A. and Duggan, S., *Vericiguat: First Approval*. Drugs, 2021. 81(6): p. 721-726.
317. EMA, *Summary of opinion (initial authorisation) - Verquo - vericiguat*, in EUROPEAN MEDICINES AGENCY - SCIENCE MEDICINES HEALTH. 2021.
318. EMA, *Verquo (vericiguat) - An overview of Verquo and why it is authorised in the EU*, in EUROPEAN MEDICINES AGENCY - SCIENCE MEDICINES HEALTH. 2021. EMA/309094/2021.



## 7. Anhang



**Abb. 7.1:** Zeitlicher Verlauf weiterer kardialer Funktionsparameter Sham- und TAC-operierter Tiere innerhalb der verschiedenen Behandlungsgruppen. Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  SD weiterer erhobener Daten der echokardiographischen Analysen. Medikationsbeginn nach 3 Wochen post-OP (W3). TAC führte zu einem Anstieg des linksventrikulären endsystolischen Volumens (LVEDV) und des linksventrikulären endsystolischen inneren Durchmessers (LVID;s) im Vergleich zu Sham-Tieren. Die Behandlung mit Riociguat schwächte diese Effekte bei TAC-Mäusen im Vergleich zu lösungsmittelbehandelten TAC-Tieren ab. Das linksventrikuläre enddiastolische Volumen (LVEDV) und der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVID;d) wurden nicht durch Riociguat beeinflusst. (n = 6, außer Sham/LM: n = 5; TAC/LM vs. Sham/LM: \*\*\* p < 0,001, \*\* p < 0,01, \* p < 0,05; TAC/RIO vs. TAC/LM: ### p < 0,001, ## p < 0,01, # p < 0,05)

**Tabelle 7.1: Werte weiterer kardialer Funktionsparameter.** Die Tabelle zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SD von LVID;s, LVID;d, LVESV und LVEDV. Signifikante Unterschiede sind in TAC im Vergleich zur entsprechenden Sham-Gruppe gekennzeichnet. (\*\*\*)  $p < 0,001$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*)  $p < 0,05$ )

	LVID;s (mm)				LVID;d (mm)			
	Sham/LM	TAC/LM	Sham/RIO	TAC/RIO	Sham/LM	TAC/LM	Sham/RIO	TAC/RIO
<b>Base</b>	2,9 $\pm$ 0,15	2,9 $\pm$ 0,11	3,2 $\pm$ 0,21	2,9 $\pm$ 0,21	4,0 $\pm$ 0,13	4,1 $\pm$ 0,10	4,3 $\pm$ 0,17	4,1 $\pm$ 0,19
<b>W1</b>	3,0 $\pm$ 0,22	3,4 $\pm$ 0,14	3,2 $\pm$ 0,26	3,4 $\pm$ 0,19	4,2 $\pm$ 0,25	4,3 $\pm$ 0,12	4,4 $\pm$ 0,33	4,2 $\pm$ 0,15
<b>W2</b>	3,0 $\pm$ 0,17	3,7 $\pm$ 0,28 ***	3,2 $\pm$ 0,37	3,8 $\pm$ 0,17 **	4,1 $\pm$ 0,18	4,5 $\pm$ 0,28	4,4 $\pm$ 0,30	4,5 $\pm$ 0,16
<b>W3</b>	3,2 $\pm$ 0,20	3,9 $\pm$ 0,12 ***	3,3 $\pm$ 0,10	3,9 $\pm$ 0,16 **	4,4 $\pm$ 0,22	4,6 $\pm$ 0,14	4,6 $\pm$ 0,11	4,6 $\pm$ 0,16
<b>W4</b>	3,1 $\pm$ 0,18	4,1 $\pm$ 0,28 ***	3,4 $\pm$ 0,15	3,9 $\pm$ 0,22 *	4,2 $\pm$ 0,19	4,8 $\pm$ 0,22 *	4,5 $\pm$ 0,14	4,7 $\pm$ 0,19
<b>W5</b>	3,0 $\pm$ 0,17	4,2 $\pm$ 0,38 ***	3,2 $\pm$ 0,17	3,7 $\pm$ 0,28 *	4,2 $\pm$ 0,10	4,7 $\pm$ 0,34 *	4,5 $\pm$ 0,25	4,6 $\pm$ 0,28
<b>W6</b>	3,1 $\pm$ 0,19	4,2 $\pm$ 0,42 ***	3,2 $\pm$ 0,15	3,7 $\pm$ 0,49 *	4,3 $\pm$ 0,16	4,7 $\pm$ 0,40	4,4 $\pm$ 0,13	4,6 $\pm$ 0,42
<b>W7</b>	3,1 $\pm$ 0,18	4,2 $\pm$ 0,49 ***	3,1 $\pm$ 0,20	3,5 $\pm$ 0,51	4,3 $\pm$ 0,17	4,7 $\pm$ 0,47 *	4,3 $\pm$ 0,19	4,5 $\pm$ 0,43
<b>W8</b>	3,0 $\pm$ 0,25	4,2 $\pm$ 0,46 ***	3,1 $\pm$ 0,13	3,7 $\pm$ 0,47 **	4,1 $\pm$ 0,25	4,7 $\pm$ 0,41 **	4,3 $\pm$ 0,18	4,6 $\pm$ 0,43
	LVESV ( $\mu$ l)				LVEDV ( $\mu$ l)			
	Sham/LM	TAC/LM	Sham/RIO	TAC/RIO	Sham/LM	TAC/LM	Sham/RIO	TAC/RIO
<b>Base</b>	31,8 $\pm$ 3,9	32,4 $\pm$ 3,0	40,5 $\pm$ 6,4	33,0 $\pm$ 5,6	70,8 $\pm$ 5,2	74,6 $\pm$ 4,2	85,6 $\pm$ 7,9	75,2 $\pm$ 7,8
<b>W1</b>	36,4 $\pm$ 6,2	48,3 $\pm$ 4,6	41,2 $\pm$ 7,9	46,4 $\pm$ 6,1	79,9 $\pm$ 10,9	84,3 $\pm$ 5,6	87,3 $\pm$ 14,7	80,4 $\pm$ 6,6
<b>W2</b>	34,7 $\pm$ 4,8	60,1 $\pm$ 10,7 **	41,7 $\pm$ 11,7	60,9 $\pm$ 6,1 *	75,8 $\pm$ 7,6	91,7 $\pm$ 13,3	87,5 $\pm$ 14,0	91,8 $\pm$ 7,4
<b>W3</b>	41,3 $\pm$ 6,3	65,5 $\pm$ 4,7 **	45,7 $\pm$ 3,3	66,9 $\pm$ 6,5 **	87,6 $\pm$ 10,1	96,6 $\pm$ 7,0	97,4 $\pm$ 5,5	97,0 $\pm$ 8,0
<b>W4</b>	37,1 $\pm$ 5,1	76,4 $\pm$ 12,0 ***	46,0 $\pm$ 4,8	65,4 $\pm$ 8,7 *	80,7 $\pm$ 8,6	105,2 $\pm$ 11,5 *	94,2 $\pm$ 6,6	104,6 $\pm$ 9,5
<b>W5</b>	36,4 $\pm$ 5,1	77,7 $\pm$ 17,2 ***	42,4 $\pm$ 5,5	59,8 $\pm$ 10,4 *	77,7 $\pm$ 4,6	101,6 $\pm$ 17,6 *	92,6 $\pm$ 11,8	97,3 $\pm$ 13,4
<b>W6</b>	38,5 $\pm$ 5,8	79,1 $\pm$ 19,9 ***	42,3 $\pm$ 4,9	60,8 $\pm$ 17,5 *	83,0 $\pm$ 7,5	101,1 $\pm$ 21,6	89,1 $\pm$ 6,0	100,3 $\pm$ 20,3
<b>W7</b>	38,9 $\pm$ 5,4	82,0 $\pm$ 24,0 ***	38,7 $\pm$ 6,0	53,9 $\pm$ 17,3	81,3 $\pm$ 7,4	104,3 $\pm$ 26,2 *	81,7 $\pm$ 8,8	94,7 $\pm$ 20,1
<b>W8</b>	35,6 $\pm$ 7,1	82,0 $\pm$ 22,1 ***	38,5 $\pm$ 3,9	57,7 $\pm$ 16,9 *	76,3 $\pm$ 11,0	102,8 $\pm$ 22,0 **	84,1 $\pm$ 8,1	100,2 $\pm$ 20,5

Die folgenden zusätzlichen Anhang-Tabellen S1-S8 befinden sich auf der beiliegenden CD.

**Anhang S1: Veränderungen der Genexpression zwischen den verschiedenen Vergleichsgruppen TAC und Sham operierter Mäuse mit bzw. ohne medikamentöser Behandlung.** Die Tabelle zeigt die Expressionsveränderungen aller identifizierten Transkripte nach TAC unter Lösungsmittelgabe (TAC/LM vs. Sham/LM) und Riociguatmedikation (TAC/RIO vs. Sham/RIO). Des Weiteren sind die direkten Auswirkungen einer RIO-Behandlung zwischen TAC-Tieren (TAC/RIO vs. TAC/LM) als auch gesunden Sham-Tieren (Sham/RIO vs. Sham/LM) dargestellt. Es sind alle identifizierten Transkripte mit Signifikanzwerten, *Fold Changes* und deren *Readcounts* aus den RNA-Seq Analysen (**S1-I\_Seq\_Counts**) und der NanoString-Validierung (**S1-II\_NSTG\_Counts**) zusammengefasst. (LM: Lösungsmittelgabe; N/A: *not available*; NSTG: NanoString nCounter®; RIO: Riociguatmedikation; Seq: RNA-Seq; RNA-Sequenzierung; Sham: Scheinoperation; TAC: transverse Aortenkonstriktion)

**Anhang S2: Auflistung aller signifikant veränderten und CVD assoziierten DEGs der verschiedenen Vergleichsgruppen.** Die Tabelle zeigt alle aufgrund von TAC signifikant veränderten DEGs ( $q < 0,05$ ;  $FC \geq |2|$ ), die der Oberkategorie kardiovaskulärer Erkrankungen (**S2-I\_CVD assoziierte DEGs**) zugeordnet werden konnten und deren Verteilung auf die untergeordneten Kardiotoxizitätsfunktionen (**S2-II\_KardioTox**). Signifikanzwerte und Expressionsveränderungen aller Vergleichsgruppen ( $TAC_{LM}$  vs.  $Sham_{LM}$ ,  $TAC_{RIO}$  vs.  $Sham_{RIO}$ ,  $TAC_{RIO}$  vs.  $TAC_{LM}$ ,  $Sham_{RIO}$  vs.  $Sham_{LM}$ ) sind gegenübergestellt. (CVD: kardiovaskuläre Erkrankungen; DEG: differentiell exprimierte Gene; FC: *Fold Change*; LM: Lösungsmittelgabe; RIO: Riociguatmedikation; Sham: Scheinoperation; TAC: transverse Aortenkonstriktion)

**Anhang S3: Veränderungen der Proteinabundanz zwischen den verschiedenen Vergleichsgruppen TAC und Sham operierter Mäuse mit bzw. ohne medikamentöser Behandlung.** Die Tabelle zeigt die Proteinveränderungen nach TAC unter Lösungsmittelgabe ( $TAC_{LM}$  vs.  $Sham_{LM}$ ) und Riociguatmedikation ( $TAC_{RIO}$  vs.  $Sham_{RIO}$ ). Des Weiteren sind die direkten Auswirkungen einer RIO-Behandlung zwischen TAC-Tieren ( $TAC_{RIO}$  vs.  $TAC_{LM}$ ) als auch gesunden Sham-Tieren ( $Sham_{RIO}$  vs.  $Sham_{LM}$ ) dargestellt. Es sind alle identifizierten Proteine zusammen mit ihrer zellulären Lokalisation, Signifikanzwerten, *Fold Changes* und Zuordnungen aus der *absent/present* Analyse zusammengefasst. (LM: Lösungsmittelgabe; N/A: *not available*; RIO: Riociguatmedikation; Sham: Scheinoperation; TAC: transverse Aortenkonstriktion)

**Anhang S4: Auflistung aller signifikant veränderten und CVD assoziierten Proteine der verschiedenen Vergleichsgruppen.** Die Tabelle zeigt alle aufgrund von TAC signifikant veränderten Proteine ( $p < 0,05$ ;  $FC \geq |1,3|$ ), die der Oberkategorie kardiovaskulärer Erkrankungen (**S4-I\_CVD assoziierte Proteine**) zugeordnet werden konnten und deren Verteilung auf die untergeordneten Kardiotoxizitätsfunktionen (**S4-II\_KardioTox**). Signifikanzwerte und Abundanzveränderungen aller Vergleichsgruppen ( $TAC_{LM}$  vs.  $Sham_{LM}$ ,  $TAC_{RIO}$  vs.  $Sham_{RIO}$ ,  $TAC_{RIO}$  vs.  $TAC_{LM}$ ,  $Sham_{RIO}$  vs.  $Sham_{LM}$ ) sind gegenübergestellt sowie die zelluläre Lokalisation und Peptidanzahl entsprechender Proteine. (Proteinidentifikation  $\geq 2$  Peptide) (CVD: kardiovaskuläre Erkrankungen; FC: *Fold Change*; LM: Lösungsmittelgabe; RIO: Riociguatmedikation; Sham: Scheinoperation; TAC: transverse Aortenkonstriktion)

**Anhang S5: Vergleichende und quantitative Gegenüberstellung der Transkriptom- und Proteomdaten.** Die Tabelle listet alle Expressions- und Proteinveränderungen der 1359 Transkripte bzw. Proteine auf, die als Überschneidung sowohl in den RNA-Seq (**S1**) als auch in den MS/MS-Analysen (**S3**) identifiziert und quantifiziert wurden. Die Gegenüberstellungen beinhalten die

Veränderungen nach TAC unter Lösungsmittelgabe ( $TAC_{/LM}$  vs.  $Sham_{/LM}$ ) und Riociguatmedikation ( $TAC_{/RIO}$  vs.  $Sham_{/RIO}$ ). Des Weiteren sind die direkten Auswirkungen einer RIO-Behandlung zwischen TAC-Tieren ( $TAC_{/RIO}$  vs.  $TAC_{/LM}$ ) als auch gesunden Sham-Tieren ( $Sham_{/RIO}$  vs.  $Sham_{/LM}$ ) dargestellt. Alle identifizierten Veränderungen sind mit Gen- bzw. Protein-IDs, zellulärer Lokalisation, Signifikanzwerten und *Fold Changes* zusammengefasst. (LM: Lösungsmittelgabe; MS/MS: Tandem-Massenspektrometrie; N/A: *not available*; RIO: Riociguatmedikation; RNA-Seq: RNA-Sequenzierung; Sham: Scheinoperation; TAC: transverse Aortenkonstriktion)

**Anhang S6: Veränderungen der microRNA-Expression zwischen den verschiedenen Vergleichsgruppen TAC und Sham operierter Mäuse mit bzw. ohne medikamentöser Behandlung.** Die Tabelle zeigt die Expressionsveränderungen aller identifizierten microRNAs nach TAC unter Lösungsmittelgabe ( $TAC_{/LM}$  vs.  $Sham_{/LM}$ ) und Riociguatmedikation ( $TAC_{/RIO}$  vs.  $Sham_{/RIO}$ ). Des Weiteren sind die direkten Auswirkungen einer RIO-Behandlung zwischen TAC-Tieren ( $TAC_{/RIO}$  vs.  $TAC_{/LM}$ ) als auch gesunden Sham-Tieren ( $Sham_{/RIO}$  vs.  $Sham_{/LM}$ ) dargestellt. Es sind alle identifizierten microRNAs mit Signifikanzwerten, *Fold Changes* und deren *Readcounts* aus den miRNA-Seq Analysen (**S6-I miRNA-Seq Counts**) zusammengefasst. (LM: Lösungsmittelgabe; N/A: *not available*; RIO: Riociguatmedikation; miRNA-Seq: microRNA-Sequenzierung; Sham: Scheinoperation; TAC: transverse Aortenkonstriktion)

**Anhang S7: Expressionspaarungen aller identifizierten microRNA-mRNA-Interaktionen aus der microRNA Target Filter Analyse.** Die Tabelle zeigt eine vollständige Auflistung aller signifikant veränderten microRNAs ( $q < 0,05$ ) zusammen mit allen potentiellen mRNA-Interaktionspartnern (*Targets*) aus den beiden Datensätzen der Vergleichsgruppen  $TAC_{/LM}$  vs.  $Sham_{/LM}$  (**S7-I TACvsSham-LM**) und  $TAC_{/RIO}$  vs.  $Sham_{/RIO}$  (**S7-II TACvsSham-RIO**). (LM: Lösungsmittelgabe; RIO: Riociguatmedikation; Sham: Scheinoperation; TAC: transverse Aortenkonstriktion)

**Anhang S8: Expressionspaarungen aller identifizierten microRNA-Target-Interaktionen aus der microRNA Target Filter Analyse basierend auf den Proteomdaten.** Die Tabelle zeigt eine vollständige Auflistung aller signifikant veränderten microRNAs ( $q < 0,05$ ) zusammen mit allen potentiellen mRNA-Interaktionspartnern (*Targets*) basierend auf den beiden Proteom-Datensätzen der Vergleichsgruppen  $TAC_{/LM}$  vs.  $Sham_{/LM}$  (**S8-I TACvsSham-LM**) und  $TAC_{/RIO}$  vs.  $Sham_{/RIO}$  (**S8-II TACvsSham-RIO**). (LM: Lösungsmittelgabe; RIO: Riociguatmedikation; Sham: Scheinoperation; TAC: transverse Aortenkonstriktion)

## Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Greifswald noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel und Hilfen benutzt und keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen habe.

---

Alexander Benkner



# Publikationen und Kongressbeiträge

## Originalpublikationen

**Alexander Benkner**, Julia Rüdebusch, Neetika Nath, Elke Hammer, Karina Grube, Stefan Gross, Vishnu M. Dhople, Gertrud Eckstein, Thomas Meitinger, Lars Kaderali, Uwe Völker, Jens Fielitz, and Stephan B. Felix. *Riociguat attenuates left ventricular proteome and microRNA profile changes after experimental aortic stenosis in mice*. (Submitted and under revision in Br J Pharmacol, October 2021)

Julia Rüdebusch, **Alexander Benkner**, Neetika Nath, Lina Fleuch, Lars Kaderali, Karina Grube, Karin Klingel, Gertrud Eckstein, Thomas Meitinger, Jens Fielitz, and Stephan B. Felix. *Stimulation of soluble guanylyl cyclase (sGC) by riociguat attenuates heart failure and pathological cardiac remodelling*. Br J Pharmacol, 2020. Online ahead of print. (doi: 10.1111/bph.15333)

Julia Rüdebusch\*, **Alexander Benkner\***, Axel Poesch, Marcus Dörr, Uwe Völker, Karina Grube, Elke Hammer, and Stephan B. Felix. *Dynamic adaptation of myocardial proteome during heart failure development*. PLoS One, 2017. 12(10): p. e0185915. (doi: 10.1371/journal.pone.0185915)

\* contributed equally

## Publizierte Abstracts

Julia Rüdebusch, **Alexander Benkner**, Mathias C. Busch, Karina Grube, Jens Fielitz, and Stephan B. Felix. *Extended infusion of serelaxin has no effect on pressure overload induced heart failure in mice*. Clin Res Cardiol 109, Suppl 1, April 2020 - P1891. (doi: 10.1007/s00392-020-01621-0) \*

**Alexander Benkner**, Julia Rüdebusch, Karina Grube, Karin Klingel, Eric Witt, Vishnu. M. Dhople, Elke Hammer, and Stephan B. Felix. *Soluble Guanylate Cyclase as Therapeutic Target in Heart Failure: Functional and Proteomic Dynamics in Response to sGC stimulation after Experimental Aortic Stenosis in Mice*. Clin Res Cardiol 108, Suppl 1, April 2019 - V111. (doi: 10.1007/s00392-019-01435-9) #

**Alexander Benkner**, Julia Rüdebusch, Karin Klingel, Elke Hammer, Eric Witt, Vishnu M. Dhople, Marcus Dörr, Stephan B. Felix, and Karina Grube. *Influence of the Soluble Guanylate Cyclase Stimulator Riociguat on Myocardial Function and Proteome after Experimental Aortic Stenosis in Mice*. The FASEB Journal, 2018. 32(1\_supplement): p. 903.9-903.9. (doi: 10.1096/fasebj.2018.32.1\_supplement.903.9) \*

**Alexander Benkner**, Julia Rüdebusch, Karin Klingel, Elke Hammer, Eric Witt, Vishnu M. Dhople, Marcus Dörr, Stephan B. Felix, and K. Grube. *P582 - Effects of the soluble guanylate cyclase stimulator riociguat in pressure-overload induced heart failure in mice*. European Heart Journal, 2017. 38(suppl\_1): p. ehx501.P582-ehx501.P582. (doi: 10.1093/eurheartj/ehx501.P582) \*

Julia Rüdebusch, **Alexander Benkner**, Karin Klingel, Marcus Dörr, Stephan B. Felix, and **Karina Grube**. *P3119 - Stimulation of the soluble guanylate cyclase attenuates pressure-overload induced cardiac hypertrophy in mice*. European Heart Journal, 2016. 37(suppl\_1), p. 619-620. (doi: 10.1093/eurheartj/ehw433) \*

**Alexander Benkner**, Julia Rüdebusch, Axel Poesch, Marcus Dörr, Uwe Völker, Stephan B. Felix, and Karina Grube. *P4736 - Wnt-signaling plays a critical role in cardiac hypertrophy and heart failure progression in mice*. European Heart Journal, 2015. 36(suppl\_1), p. 833-834. (doi: 10.1093/eurheartj/ehv400) \*



Julia Rüdebusch, Karina Grube, **Alexander Benkner**, Axel Poesch, Marcus Dörr, Sabine Ameling, Uwe Völker, and Stephan B. Felix. *P1726 - Time course transcriptome analysis after transverse aortic constriction in mice revealed Wnt-signaling as a relevant factor of heart failure progression*. European Heart Journal, 2014. 35(suppl\_1), p. 327. (doi: 10.1093/eurheartj/ehu323) \*

**Alexander Benkner**, Julia Rüdebusch, Karina Grube, Elke Hammer, Marcus Dörr, Uwe Völker, and Stephan B. Felix. *Time dependent proteomic changes in heart failure progression after transverse aortic constriction in mice*. Clin Res Cardiol 103, Suppl 1, April 2014 - P1373. (doi: 10.1007/s00392-014-1100-9) \*

\* [Poster presentation]

# [Talk]

Presenting author



# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich unterstützt haben.

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Stephan B. Felix aus der Klinik für Innere Medizin B für die Möglichkeit zur Anfertigung der Dissertation in der KIM B und Prof. Dr. Uwe Völker aus der funktionellen Genomforschung für die erfolgreiche Zusammenarbeit, das stetige Interesse am Fortschritt der Arbeit und deren Begutachtung.

Besonders möchte ich Dr. Elke Hammer danken, da ihre große Hilfsbereitschaft, die zahlreichen und konstruktiven Diskussionen und ihre grenzenlose Geduld maßgeblich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. Jens Fielitz, der vor allem in den Phasen der Manuskriptstellungen jederzeit mit konstruktiven Ratschlägen und Hilfe bei jeglichen Nachfragen bereitstand und das gesamte Projekt mit zum Erfolg geführt hat.

Großer Dank gilt auch Dr. Karina Grube und Dr. Julia Rüdebusch für die Betreuung und Zusammenarbeit während der gemeinsamen Zeit im kardiologischen Forschungslabor.

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. Thomas Meitinger und Kollegen für die Sequenzierung der Proben in München danken, sowie Dr. Neetika Nath und Dr. Stefan Groß für die Hilfe und Unterstützung bei der bioinformatischen und statistischen Auswertung dieser riesigen Datenmengen. Für die massenspektrometrische Vermessung der Proben danke ich ebenfalls Dr. Vishnu M. Dhople.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch dem DZHK (Deutsches Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung) für die finanzielle Ermöglichung des Projektes und für die Möglichkeit, an zahlreichen Weiterbildungen, Kongressbesuchen und Forschungsaufenthalten teilzunehmen.

Brita Püschel, Lucy Dietzsch, Lisa Loerzer und Roswitha Dressler danke ich herzlich für die tolle Zusammenarbeit im Laboralltag und ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung in allen Belangen.

Natürlich danke ich auch allen weiteren Kolleginnen und Kollegen der KIM B und der funktionellen Genomforschung für die Hilfsbereitschaft bei Problemen jedweder Art, die freundliche Kommunikation, die schönen Zeiten und die nette Arbeitsatmosphäre.

Ich möchte außerdem Jenny Thalheim für ihre Hilfe bei der Erstellung hochauflösender digitaler Abbildungen danken. Nie gab es schönere zirkuläre Heatmaps.

Ein sehr persönliches Dankeschön geht an Netti, Tina und Lisa, die vor allem in der letzten Phase des Zusammenschreibens eine große mentale Stütze waren und mich mit zahlreichen „Survival“-Paketen versorgt haben.

Auch danke ich Andreas, Kristin und Rico für die gemeinsame Zeit im Forschungscluster und die oftmals sehr unterhaltsame Ablenkung mit sowohl professionellen als auch unprofessionellen Gesprächen abseits des Laboralltags.

Gleichzeitig möchte ich neben den vielen anderen guten Freunden vor allem Ed, Max und Micha besondere Erwähnung widmen. Vielen Dank für die immer wieder willkommene Zerstreuung während unserer musikalischen Abenteuer im Proberaum oder auf der Bühne. Ohne die Musik und die Band wären die Jahre in Greifswald nur halb so schön gewesen.

Das größte Dankeschön gilt meiner Familie und vor allem meiner Mutter, die mir bereits während des Studiums und seither immer wieder mit aufmunternden Worten und dem größtmöglichen Verständnis stets zur Seite stand. Ohne sie wäre mein akademischer Werdegang nicht möglich gewesen.