

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

# **Hypermethylierte DNA als Biomarker für Herz- und Nierenerkrankungen**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

**Christin Eller**

aus

Hildesheim

Göttingen 2022

Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Brück
Referent/in:	Prof. Dr. Elisabeth Zeisberg
Ko-Referent/in:	PD Dr. Dr. Moritz Thomas Schnelle
Drittreferent/in:	Prof. Dr. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 05.07.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Hypermethylierte DNA als Biomarker für Herz- und Nierenerkrankungen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

.....  
(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Klinische Relevanz von chronischen Nierenerkrankungen und epigenetischen Regulationsmechanismen.....	1
1.2 Pathophysiologie der Fibrose.....	2
1.3 DNA-Methylierung.....	3
1.4 Screening methylierter Gene .....	4
1.5 <i>RAS protein activator like 1 (RASAL1)</i> .....	4
1.6 Zirkulierende DNA-Fragmente im Blut.....	6
1.7 Zielsetzung .....	7
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>8</b>
2.1 Material.....	8
2.1.1 Geräte.....	8
2.1.2 Software.....	9
2.1.3 Gebrauchsmaterialien .....	9
2.1.4 Chemikalien.....	10
2.1.5 Kitsysteme .....	10
2.1.6 Ansatz für quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	10
2.1.7 Primer für quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	11
2.1.8 Patientenkollektiv .....	11
2.2 Methoden.....	13
2.2.1 Isolation peripherer Blutlymphozyten .....	13
2.2.2 Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP).....	13
2.2.3 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	15
2.2.4 Statistische Auswertung.....	15
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>16</b>
3.1 Etablierung von methylierter <i>RASAL1</i> -DNA in peripheren Blutlymphozyten.....	16
3.2 Validierung.....	17
3.2.1 Validierung von methylierter DNA im Kontext der Nierenfunktion.....	17
3.2.2 Korrelationen von methylierter DNA, Leukozyten und Entzündungswerten .....	19
3.2.3 Korrelationen von methylierter DNA und allgemeinen Patientencharakteristika.....	22
3.2.4 Korrelationen von methylierter DNA und Nierenretentionsparametern.....	25
3.3 Analysen von methylierter <i>EPO</i> -DNA.....	30

---

3.4	Analysen von methylierter DNA und Erkrankungen mit kardiovaskulärer Pathologie .....	34
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>47</b>
4.1	Methylierte <i>RASAL1</i> -DNA in peripheren Blutlymphozyten nierenkranker Patienten .....	47
4.2	Methylierte <i>RASAL1</i> -DNA als möglicher Biomarker für Nierenfibrose .....	48
4.3	Identifikation von aberranter DNA-Methylierung in weiteren Genen .....	49
4.4	Methylierte <i>EPO</i> -DNA im Kontext der renalen Anämie.....	51
4.5	Methylierte DNA im Hinblick auf Erkrankungen mit kardiovaskulärer Pathologie.....	53
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>60</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entstehung eines 5-Methyl-Cytosins.....	3
Abbildung 2: Einfluss von RASAL1 auf die Aktivierung von Fibroblasten.....	5
Abbildung 3: Screeninganalyse von methylierter <i>RASAL1</i> -DNA und der Nierenfunktion .....	16
Abbildung 4: Validierungsanalyse von methylierter DNA und der Nierenfunktion.....	18
Abbildung 5: Korrelationen von methylierter DNA zur Leukozytenzahl .....	20
Abbildung 6: Korrelationen von methylierter DNA zum CRP.....	21
Abbildung 7: Korrelationen von methylierter DNA zum Alter .....	23
Abbildung 8: Analysen von methylierter DNA und dem Geschlecht.....	24
Abbildung 9: Korrelationen von methylierter DNA zum Kreatinin .....	27
Abbildung 10: Korrelationen von methylierter DNA zur eGFR.....	28
Abbildung 11: Korrelationen von methylierter DNA zum Harnstoff-N.....	29
Abbildung 12: Korrelationen von methylierter <i>RASAL1</i> - und <i>EPO</i> -DNA zum Hämoglobin.....	32
Abbildung 13: Analysen von methylierter <i>EPO</i> -DNA und allgemeinen Patientencharakteristika (Alter, Geschlecht).....	32
Abbildung 14: Korrelationen von methylierter <i>EPO</i> -DNA zur Leukozytenzahl und zum CRP.....	33
Abbildung 15: Analysen von methylierter <i>EPO</i> -DNA und der Nierenfunktion .....	33
Abbildung 16: Analysen von methylierter DNA in Patienten mit und ohne bekannte Herzinsuffizienz (HF) .....	37
Abbildung 17: Analysen von methylierter DNA in Patienten mit Herzinsuffizienz (HF) zur Nierenfunktion.....	38
Abbildung 18: Analysen von methylierter DNA in Patienten mit und ohne bekannte KHK.....	40
Abbildung 19: Analysen von methylierter DNA in Patienten mit KHK zur Nierenfunktion .....	41
Abbildung 20: Analysen von methylierter DNA in Patienten mit und ohne eingeschränkte EF (enge. EF).....	43
Abbildung 21: Analysen von methylierter DNA in Patienten mit eingeschränkter EF zur Nierenfunktion.....	44
Abbildung 22: Korrelationen von methylierter DNA zur Ejektionsfraktion .....	46

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	8
Tabelle 2: Software.....	9
Tabelle 3: Gebrauchsmaterialien.....	9
Tabelle 4: Chemikalien.....	10
Tabelle 5: Kitsysteme.....	10
Tabelle 6: Ansatz für qRT-PCR.....	10
Tabelle 7: Primer für qRT-PCR.....	11
Tabelle 8: Screeninganalyse von methylierter <i>RASAL1</i> -DNA und der Nierenfunktion.....	16
Tabelle 9: Validierungsanalyse von methylierter DNA und der Nierenfunktion.....	17
Tabelle 10: Analyse von methylierter DNA in Korrelation zur Leukozytenzahl.....	19
Tabelle 11: Analyse von methylierter DNA in Korrelation zum CRP.....	19
Tabelle 12: Analyse von methylierter DNA in Korrelation zum Alter.....	22
Tabelle 13: Analyse von methylierter DNA und dem Geschlecht.....	22
Tabelle 14: Analyse von methylierter DNA in Korrelation zum Kreatinin.....	25
Tabelle 15: Analyse von methylierter DNA in Korrelation zur eGFR.....	26
Tabelle 16: Analyse von methylierter DNA in Korrelation zum Harnstoff-N.....	26
Tabelle 17: Korrelation von methylierter <i>RASAL1</i> -DNA zum Hämoglobin.....	30
Tabelle 18: Analyse von methylierter <i>EPO</i> -DNA.....	31
Tabelle 19: Analyse von methylierter DNA in Patienten mit und ohne bekannte Herzinsuffizienz (HF).....	35
Tabelle 20: Analyse von methylierter DNA in Patienten mit Herzinsuffizienz (HF) zur Nierenfunktion.....	36
Tabelle 21: Analyse von methylierter DNA in Patienten mit und ohne bekannte KHK.....	39
Tabelle 22: Analyse von methylierter DNA in Patienten mit KHK zur Nierenfunktion.....	39
Tabelle 23: Analyse von methylierter DNA in Patienten mit und ohne eingeschränkte Ejektionsfraktion (einge. EF).....	42
Tabelle 24: Analyse von methylierter DNA in Patienten mit eingeschränkter EF (einge. EF) zur Nierenfunktion.....	42
Tabelle 25: Analyse von methylierter DNA in Korrelation zur Ejektionsfraktion (EF).....	45
Tabelle A.1: Übersicht Patientenkollektiv.....	57

## Abkürzungsverzeichnis

cfDNA	zellfreie DNA
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
CRP	C-reaktives Protein
Ct	<i>cycle threshold</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Ejektionsfraktion
eing. EF	eingeschränkte Ejektionsfraktion
eGFR	geschätzte glomeruläre Filtrationsrate
EPO	Erythropoetin
FEZ1	<i>fasciculation and elongation protein zeta 1</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HF	Herzinsuffizienz
HIPK1	<i>homeodomain interacting protein kinase 1</i>
KHK	Koronare Herzkrankheit
MeDIP	<i>methylated DNA immunoprecipitation</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
PAX3	<i>paired box 3</i>
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RASAL1	<i>RAS protein activator like 1</i>
U/Minute	Umdrehungen pro Minute
SEM	Standardfehler
Ta	Annealingtemperatur
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor beta</i>



# 1 Einleitung

## 1.1 Klinische Relevanz von chronischen Nierenerkrankungen und epigenetischen Regulationsmechanismen

Chronische Nierenerkrankungen stellen weltweit eine medizinische Herausforderung dar und sind ein Gesundheitsproblem, das eine steigende Inzidenz und ein oft schlechtes Outcome aufweist (Levey et al. 2003; Ruggenti et al. 2012; Tampe und Zeisberg 2014). Zudem erfordert die Therapie dieser Erkrankungen häufig hohe Behandlungskosten, so dass eine Etablierung von effektiven Therapiestrategien und prädiktiven Tests sowohl im Hinblick auf eine verbesserte Prognose als auch auf eine Reduktion der ökonomischen Belastung attraktiv erscheint (Levey et al. 2003; Ruggenti et al. 2012). Es ist bis heute nicht vollständig geklärt, warum Patienten mit derselben nephrologischen Grunderkrankung und denselben Komorbiditäten äußerst verschiedene Prognosen haben und das Fortschreiten einer chronischen Nierenerkrankung, insbesondere die Progression einer Nierenfibrose, interindividuell verschieden ist (Zeisberg und Neilson 2010; Zeisberg 2011; Tampe und Zeisberg 2012). Eine mögliche Erklärung liegt in epigenetischen Regulationsmechanismen, da das Epigenom von Mensch zu Mensch variiert und Einfluss darauf hat, wie das jeweilige Individuum auf Erkrankungen reagiert (Zeisberg und Neilson 2010; Tampe und Zeisberg 2012; Tampe und Zeisberg 2014). Aberrante Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Methylierungen als epigenetischer Mechanismus scheinen in diesem Kontext eine zentrale Rolle zu spielen und seitdem bekannt ist, dass eine vermehrte Methylierung (sog. Hypermethylierung) spezifischer Gene an der Aktivierung von Fibroblasten und Fibrogenese der Niere beteiligt ist, erscheint der Nachweis aberranter Hypermethylierung als ein attraktiver, diagnostischer Marker zur Risikostratifizierung und Abschätzung der individuellen Prognose (Bechtel et al. 2010; Zeisberg und Zeisberg 2013). Es wurden verschiedene spezifische Gene in einem genomweiten Methylierungsscreening identifiziert, welche bei der Aktivierung von Nierenfibroblasten und der Entstehung der Fibrose mitwirken können (Bechtel et al. 2010). Hierbei ist vor allem *RASAL1*, ein Inhibitor des Ras-Onkogens, in den Fokus gerückt (Bechtel et al. 2010). In Mausstudien konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass aberrante Hypermethylierung von *RASAL1* zur Fibroblastenaktivierung und Nierenfibrose beiträgt (Bechtel et al. 2010; Tampe et al. 2014). Aberrante *RASAL1*-Methylierung ist hierbei nicht auf Fibroseprozesse der Niere beschränkt, Fibrogenese in der Leber und im Herzen sind ähnlich mit einer vermehrten Methylierung von *RASAL1* assoziiert (Tao et al. 2011; Xu et al. 2015). Daher stellt aberrante DNA-Methylierung, beispielsweise von *RASAL1*, einen möglichen übergeordneten Pathomechanismus der Organfibrose dar, welcher diagnostisch genutzt werden könnte und eine

klinische Relevanz aufweist, da weltweit circa ein Drittel der natürlich auftretenden Tode mit Fibrose assoziiert sind (Zeisberg und Zeisberg 2013).

Aberrante DNA-Methylierung spielt nicht nur bei Fibroseprozessen eine wichtige Rolle. Bei Patienten mit chronischem Nierenversagen wird gehäuft auch das Auftreten einer Anämie beobachtet (Erslev und Besarab 1997). Ursächlich hierfür ist vielfach ein Mangel an Erythropoetin (EPO), da das für die Erythropoese benötigte Glykoprotein EPO zu seinem Großteil in den gesunden, adulten peritubulären Zellen der Niere gebildet und bei eingeschränkter Funktion nur geringfügig hergestellt wird (Erslev und Besarab 1997; Fisher 2003). In diesem Zusammenhang wurde in Studien berichtet, dass methylierte *EPO*-Regulationselemente die *EPO*-Expression bei Mäusen hemmen (Chang et al. 2016). Epigenetische Regulationsmechanismen im Sinne einer Hypermethylierung scheinen daher auch hier eine Rolle zu spielen. Klinisch wird ein positiver Effekt und Ausgleich hinsichtlich der renalen Anämie bei Patienten mit chronischem Nierenversagen durch die Substitution von rekombinantem humanem Erythropoetin erreicht (Erslev und Besarab 1997). Zudem konnte Meder et al. (2017) in seiner Studie zeigen, dass veränderte DNA-Methylierung in myokardialem Gewebe und korrespondierendem Blut bei dilatativer Kardiomyopathie detektierbar ist. Im Kontext mit Relaxin gelang in Studien der Nachweis einer verringerten Expression von Entzündungsmediatoren, eine Inhibierung des *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ) sowie eine Induktion von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und somit ein kardialer Schutz sowie eine antifibrotische Wirkung (Unemori und Amento 1990; Chow et al. 2012; Collino et al. 2013; Díez und Ruilope 2016). Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigten einen Verlust des Hormons Relaxin durch aberrante DNA-Methylierung. Relaxin ist ursprünglich in Untersuchungen bezüglich des Beckenligamentes identifiziert worden und erwies sich in anschließenden Analysen im Rahmen von mütterlichen Adaptationsvorgängen bei schwangeren Frauen beteiligt (Hisaw 1926; Fevold et al. 1930; MacLennan 1983). Eine lokale Relaxinproduktion sowie ein Nachweis von *RELAXIN3* ist auch für die Niere beschrieben (Samuel et al. 2004).

## 1.2 Pathophysiologie der Fibrose

Als Fibrose wird eine Vermehrung des Bindegewebes beschrieben, die durch einen pathologischen Vernarbungsprozess gekennzeichnet ist (Eddy 1996). Das Bindegewebe (sogenannte Extrazellulärmatrix) besteht aus Kollagenfasern, Proteoglykanen sowie aus Zellen, insbesondere Fibroblasten (Eddy 1996). Die Fibroblasten sind die hauptsächlichen Mediatoren der Fibrose und produzieren den Großteil extrazellulärer Matrix in parenchymatösen Organen (Zeisberg et al. 2000; Strutz und Zeisberg 2006; Tampe und Zeisberg 2012). Ihre Aktivierung kann durch

verschiedene Stimuli und Mechanismen wie beispielsweise durch TGF- $\beta$ 1 als Wachstumsfaktor, direkte Zell-Zell-Kontakte oder Umweltreize wie Hypoxie oder Hyperglykämie hervorgerufen werden (Zeisberg et al. 2000; Strutz und Zeisberg 2006). Der Hauptunterschied zwischen physiologischer Wundheilung einer akuten Verletzung und einer chronischen, progressiven Fibrose besteht darin, dass bei der physiologischen Wundheilung die Fibroblasten nur transient aktiviert sind und es im Verlauf selbstlimitierend zu einer Inaktivierung der Fibroblasten kommt (Bechtel et al. 2010; Yang et al. 2010; Zeisberg und Zeisberg 2013). Im Rahmen der chronischen und progressiven Fibrose ist dagegen die Fähigkeit zur Inaktivierung verloren gegangen und es erfolgt ein fortschreitender, narbiger Prozess mit konsekutivem Verlust von funktionellem Parenchym und einer langfristig eingeschränkten Funktion des jeweiligen Gewebes oder Organs (Bechtel et al. 2010; Tampe und Zeisberg 2012; Zeisberg und Zeisberg 2013).

### 1.3 DNA-Methylierung

Die Epigenetik befasst sich mit der Analyse von Veränderungen des DNA-Stranges und damit assoziierten Strukturen (Genom), welche von einer zur anderen Zellgeneration weitergegeben werden kann, ohne eine Veränderung der primären DNA-Sequenz, wie beispielsweise Mutationen, nach sich zu ziehen (Wu und Morris 2001; Zeisberg und Zeisberg 2013). Ein wichtiger Mechanismus dabei ist die DNA-Methylierung, im Rahmen derer eine Methylgruppe an die fünfte Position des Cytosinringes hinzugefügt wird (Herman und Baylin 2003; Boyer et al. 2006; Bernstein et al. 2007; Zeisberg und Zeisberg 2013). Durch diesen Vorgang entsteht ein 5-Methyl-Cytosin (Abbildung 1).

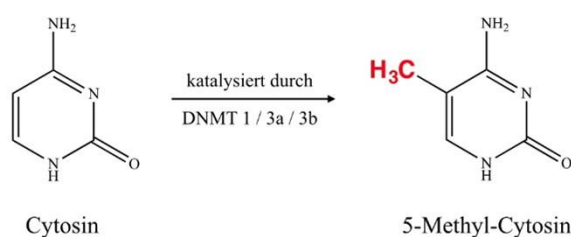


Abbildung 1: Entstehung eines 5-Methyl-Cytosins. Die Methylierung der 5. Position des Cytosinringes wird durch eine der drei DNA-Methyltransferasen (DNMT 1, DNMT 3a, DNMT 3b) katalysiert.

Diese Methylierung tritt an Cytosinresten auf, welche einem Guanin in der DNA-Sequenz vorausgehen. Die Sequenzen werden als sogenannte Cytosin-Guanin-Dinukleotide (CpG) bezeichnet (Bird und Wolffe 1999; Tampe und Zeisberg 2012). Die Cytosin-Guanin-Dinukleotide treten häufig gebündelt in kurzen DNA-Strecken von 300-3000 Basenpaaren, den sogenannten CpG-Inseln, auf (Herman und Baylin 2003; Boyer et al. 2006; Bernstein et al. 2007; Zeisberg und Zeisberg 2013). Etwa 70 Prozent der Gene weisen CpG-Inseln innerhalb von proximalen

Promotorregionen auf, wo sie meist in unmethyliertem Zustand vorliegen und nur in einem geringfügigen Anteil in der normalen und differenzierten Zelle methyliert sind (Estécio und Issa 2011; Zeisberg und Zeisberg 2013). Wenn die CpG-Inseln in der Promotorregion methyliert vorliegen, ist die transkriptionelle Genaktivität meist unterdrückt (Bird und Wolffe 1999; Mohn et al. 2008; Zeisberg und Zeisberg 2013). Dies wird einerseits direkt durch eine reduzierte Affinität von Transkriptionsfaktoren sowie andererseits durch Proteine vermittelt, welche an methylierte DNA-Abschnitte binden und so die Bindung von Transkriptionsfaktoren blockieren können (Parry und Clarke 2011; Zeisberg und Zeisberg 2013). Die Methylierung von CpG-Inseln in der Promotorregion ist im Allgemeinen ein physiologischer Prozess, um Zelldifferenzierung festzulegen und zu erhalten. Eine abweichende Methylierung, die als Hypermethylierung bezeichnet wird, und die nachfolgende Suppression der Genaktivität sind unter anderem stark in der Krebsentstehung beteiligt (Tampe et al. 2015). In diesem Rahmen konnte erstmals etabliert werden, dass durch aberrante Hypermethylierung in der Promotorregion wichtige Tumorsuppressorgene transkriptionell unterdrückt werden und zum aggressiven Phänotyp beitragen können (Zeisberg und Zeisberg 2013). Der therapeutische Nutzen einer Normalisierung solcher aberranter Hypermethylierung wird am Beispiel von 5´Azacytidin (Handelsname Vidaza®) verdeutlicht, welches als Nukleotidanalogen in die DNA replikativer Zellen eingebaut wird, die DNA-Methyltransferase inhibiert und beispielsweise in der Therapie von Patienten mit myelodysplastischen Syndrom und akuter myeloischer Leukämie einsetzbar ist oder aber auch bei renaler Fibrose eine Verbesserung erzielen kann (Bechtel et al. 2010; Itzykson und Fenaux 2012; Tampe und Zeisberg 2012; Zeisberg und Zeisberg 2013; Madanat und Sekeres 2017).

## 1.4 Screening methylierter Gene

In einem genomweiten Methylierungsscreening an Fibroblasten aus gesunden und fibrotischen Nieren konnte erstmals etabliert werden, dass bei abnormal aktivierten Fibroblasten eine veränderte Methylierung von zwölf relevanten Genen nachweisbar war: Unter anderem wiesen *FEZ1* (*fasciculation and elongation protein zeta 1*), *HIPK1* (*homeodomain interacting protein kinase 1*), *PAX3* (*paired box 3*) und *RASAL1* (*RAS protein activator like 1*) konsistent eine Promotorhypermethylierung in den fibrotischen Fibroblasten auf, wobei insbesondere *RASAL1* in den Fokus rückte (Bechtel et al. 2010).

## 1.5 *RAS protein activator like 1 (RASAL1)*

Das Gen *RASAL1* gehört zu der Ras-GAP-Familie und codiert für das RASAL1-Protein, welches zu den Ras-Guanosintriphosphatase (GTPase)-aktivierenden Proteinen zählt (Walker et al.

2004; Bechtel et al. 2010). Durch die Bindung an Guanosintriphosphat (GTP)-Ras und die Hydrolyse von GTP-Ras zu Guanosindiphosphat (GDP)-Ras katalysiert RASAL1 die Inaktivierung von aktivem Ras, vermehrtes RASAL1 führt somit zu einem erniedrigten Level von aktivem GTP-Ras (Walker et al. 2004; Kolfshoten et al. 2005; Bechtel et al. 2010). Ras ist ein Protoonkogen, welches an verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsprozessen beteiligt ist und nur im GTP-gebundenen Zustand aktiv ist (Downward 2003; Mitin et al. 2005; Bechtel et al. 2010). Eine Hypermethylierung von CpG-Inseln in der Promotorregion von *RASAL1* bewirkt einen transkriptionellen Verlust von RASAL1 und dadurch eine geringere Inhibierung von aktivem GTP-Ras mit konsekutiver Ras-Hyperaktivierung, welche kausal zur Aktivierung von Fibroblasten und deren erhöhter intrinsischer proliferativer Aktivität beiträgt (Bechtel et al. 2010). RASAL1 nimmt damit Einfluss auf die Aktivierung von Fibroblasten und die Entstehung von Fibrose (Abbildung 2).

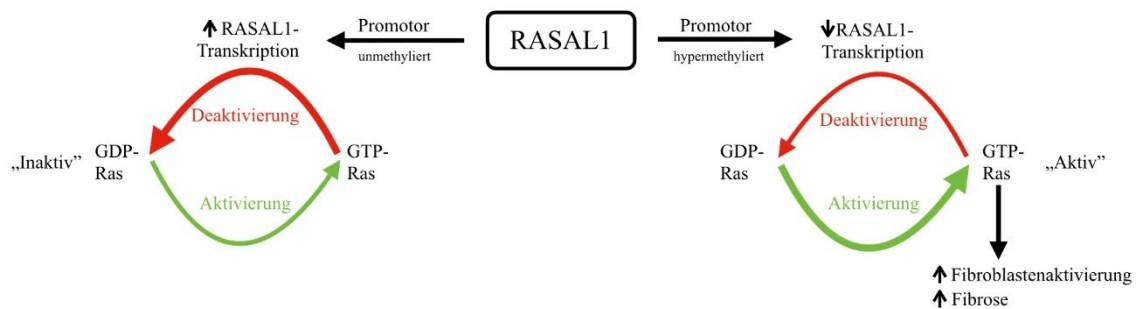


Abbildung 2: Einfluss von RASAL1 auf die Aktivierung von Fibroblasten. RASAL1 inaktiviert GTP-Ras. Eine Hypermethylierung der *RASAL1*-Promotorregion führt zu einer Suppression der RASAL1-Transkription, so dass vermehrt GDP-Ras zu GTP-Ras aktiviert werden kann. Eine zunehmende Aktivierung der Fibroblasten und Entstehung von Fibrose sind die Folge.

Sowohl bei der physiologischen Wundreparatur als auch bei der pathologischen Fibrogenese ist die Fibroblastenaktivierung mit einer Suppression der RASAL1-Expression verbunden (Bechtel et al. 2010). Allerdings ist bei einer reversiblen Fibroblastenaktivierung, welche typisch für eine physiologische Wundheilung ist, keine Hypermethylierung der CpG-Inseln in der Promotorregion von *RASAL1* detektierbar und so kommt es nach Regeneration der akuten Verletzung im Rahmen der physiologischen Wundheilung zu einer Normalisierung der *RASAL1*-Expression (Bechtel et al. 2010). Dagegen vermittelt aberrante *RASAL1*-Hypermethylierung, typisch für fibrotische Nieren, eine irreversible Suppression der RASAL1-Expression und daraus resultierend eine anhaltende Fibroblastenaktivierung (Bechtel et al. 2010). Es ist daher anzunehmen, dass eine unterdrückte Expression von *RASAL1* Bestandteil der generellen Aktivierung von Fibroblasten ist, der Mechanismus der Hypermethylierung der CpG-Inseln in der Promotorre-

gion aber zusätzlich bewirkt, dass das Zurückkehren der fibrotischen Fibroblasten in ihren Ruhemodus verhindert wird und ein Übergang in chronifizierte Fibrose stattfindet (Bechtel et al. 2010; Zeisberg und Zeisberg 2013). Ein kausaler Beitrag aberranter *RASAL1*-Hypermethylierung zu fibrotischen Prozessen parenchymatöser Organe konnte zudem in unabhängigen Studien auch für die Leber und das Herz etabliert werden (Tao et al. 2011; Xu et al. 2015). Darüber hinaus zeigten weitere Studien auch einen Einfluss von aberranter *RASAL1*-Hypermethylierung im Rahmen von onkologischen Fragestellungen (Jin et al. 2007).

## 1.6 Zirkulierende DNA-Fragmente im Blut

Im Kontext aberranter *RASAL1*-Hypermethylierung konnten Vorarbeiten zeigen, dass sich zirkulierende methylierte DNA-Promotorfragmente auch im peripheren Blut nachweisen und mit dem intrarenalen Methylierungsgrad korrelieren lassen (Tampe et al. 2015). Die Art des Nachweises von zirkulierender, zellfreier DNA (cfDNA) wurde in den letzten Jahren ebenfalls in anderen Bereichen untersucht, sie hat sich als eine weitere Methode zur Analyse von Krankheiten neben den traditionell histopathologischen Biopsien etabliert und wird auch als *Liquid Biopsy* bezeichnet (Schwarzenbach et al. 2011; Esposito et al. 2014; Diaz und Bardelli 2014). Die klinische Nutzung von cfDNA wurde beispielsweise früh im Bereich der pränatalen Schwangerschaftsdiagnostik erfolgreich etabliert und ermöglichte die Bestimmung fetaler Keimbahnveränderungen (Lo et al. 1997; Diaz und Bardelli 2014). Inzwischen konnten verschiedene Studien aus der Krebsforschung nachweisen, dass zirkulierende, mutierte cfDNA als *circulating tumor DNA* (ctDNA) im Blut detektierbar ist und DNA-Modifikationen des Primärtumors sowie seiner Metastasen repräsentieren kann (Murtaza et al. 2013; Diaz und Bardelli 2014; Francis und Stein 2015). Obwohl oftmals bei vielen Fragestellungen die Gewebegewinnung noch klinischer Goldstandard ist, ist diese zum Teil mit einigen Beschränkungen und Problemen wie der Gewebeheterogenität, hohen Kosten oder klinischen Komplikationen verbunden (Diaz und Bardelli 2014). Die Detektion von zirkulierenden DNA-Fragmenten im Blut und eine Analyse durch epigenetische Marker eröffnen daher die Möglichkeit, diese Beschränkungen zu überwinden. In diversen Studien sind Plasma oder Serum als Quelle von cfDNA zum Zweck der DNA-Extraktion verwendet worden (Gormally et al. 2007). Aufgrund geringer Mengen an Plasma- bzw. Serum-DNA kann die Grenze der Nachweisbarkeit zum Teil allerdings nicht erreicht werden. Auch ist im Hinblick auf die Bestimmung der Methylierung ein möglicher Einfluss von zirkulierenden Bestandteilen im azellulären Blutkompartiment (Plasma) nicht gänzlich ausgeschlossen. Leukozyten stellen als zellulärer Bestandteil eine weitere, ertragreiche DNA-Quelle dar und unpublizierte Daten von Tampe B et al. zeigten, dass Leukozyten die zell-freie DNA

aufnehmen und dadurch auch abbilden können. Choi et al. (2009) beleuchtete eine Assoziation von globalgenomischer Methylierung im jeweiligen Gewebe und dem Methylierungslevel peripherer Leukozyten.

## 1.7 Zielsetzung

In Tierstudien konnte bereits dargelegt werden, dass aberrante DNA-Methylierung kausal zur Fibroblastenaktivierung und Nierenfibrose beiträgt (Bechtel et al. 2010; Tampe et al. 2015). Zudem konnte in weiteren tierexperimentellen Studien gezeigt werden, dass methylierte *RASAL1*-DNA-Fragmente im Vollblut nachweisbar sind, mit dem Methylierungsgrad in der Niere korrelieren und bei zunehmender Fibrosierung der Niere ansteigen (Tampe et al. 2015). In diesem Zusammenhang sind folgende Fragestellungen Ziele dieser Arbeit:

- a) Ist die Hypermethylierung von *RASAL1* im Blut in unabhängigen Kohorten nierenkranker Patienten reproduzierbar nachweisbar?
- b) Gibt es eine Korrelation zwischen dem Level methylierter *RASAL1*-DNA im Blut und laborchemischen Parametern wie Kreatinin, geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (eGFR), Harnstoff-N, Hämoglobin, Leukozyten oder C-reaktivem Protein (CRP)?
- c) Ist der Nachweis von methylierter DNA im Blut auf *RASAL1* beschränkt oder lassen sich andere Gene identifizieren, welche in gleichem Maße im Blut nierenkranker Patienten methyliert sind?
- d) Ist der Nachweis von methylierter *RASAL1*-DNA im Blut ein spezifischer Biomarker für Nierenfibrose oder sind andere Folgeerkrankungen wie eine renale Anämie oder Erkrankungen mit kardiovaskulären Pathologien mit einer ähnlichen Akkumulation von methylierter DNA im Blut assoziiert?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

In der nachfolgenden Tabelle sind die verwendeten Geräte aufgeführt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Geräte.

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklav	Integra Bioscience, Biebertal, Deutschland
Belly dancer	Stovall Life Science, Greensboro, USA
Eismaschine	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Inkubator Heraeus	Schütt Labortechnik, Göttingen, Deutschland
Mixing Block MB 102	Bioer Technology, Hangzhou, China
NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Pipettierhilfe pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Plate centrifuge PerfectSpin P	Peqlab Biotechnology, Erlangen, Deutschland
StepOnePlus Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA
Sonicator Misonix	QSonica L.L.C, Newtown, USA
Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
Vortex VWR lab dancer	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Unity lab services, Waltham, USA
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Sigma 3-18K	SciQuip, Newtown, UK



### 2.1.2 Software

In der nachfolgenden Tabelle sind die verwendeten Softwares aufgeführt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Software.

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Ixserv.4	ixmid Software, Köln, Deutschland
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Orbis	Agfa HealthCare GmbH, Bonn, Deutschland
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, La Jolla, USA
StepOne Software 2.3	Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA

### 2.1.3 Gebrauchsmaterialien

In der nachfolgenden Tabelle sind die verwendeten Gebrauchsmaterialien aufgeführt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Gebrauchsmaterialien.

<b>Gebrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Greiner Zentrifugenröhrchen 15 ml	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Greiner Zentrifugenröhrchen 50 ml	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
MicroAmp Fast Optical Reaction 96-Well Plate	Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA
Mikroliter Pipetten 10, 100, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Optical Adhesive covers, PCR-compatible	Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA
Paraffinfilm M	Bemis, Neenah, USA
Pipettenspitzen 10, 100, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Safe-lock-Röhrchen 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Safe-lock-Röhrchen 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten 5, 10, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette EDTA (Ethylendiamintetraacetat)-K 7,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

### 2.1.4 Chemikalien

In der nachfolgenden Tabelle sind die verwendeten Chemikalien aufgeführt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Dulbecco's <i>phosphate-buffered saline</i> (PBS), (1x), steril	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
Ethanol (99,8 %)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fast SYBR Green Mastermix	Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA
Lymphocyte Separation Medium (LSM) 1077	PAA Laboratories, GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland
Nukleasefreies Wasser	Quiagen, Hilden, Deutschland

### 2.1.5 Kitsysteme

In der nachfolgenden Tabelle sind die verwendeten Kitsysteme aufgeführt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Kitsysteme.

Kitsystem	Hersteller
DNeasy Blood & Tissue Kit (250)	Quiagen, Hilden, Deutschland
Methylamp Methylated DNA Capture Kit	Epigentek, Farmingdale, USA

### 2.1.6 Ansatz für quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

In der nachfolgenden Tabelle ist der verwendete Ansatz für die quantitative Real-Time PCR näher beschrieben (Tabelle 6).

Tabelle 6: Ansatz für qRT-PCR.

Flüssigkeit	Menge
SYBR Green Mastermix	10 µl
Vorwärtsprimer 20 µM	0,2 µl
Rückwärtsprimer 20 µM	0,2 µl
Nukleasefreies Wasser (NFW)	4,6 µl

### 2.1.7 Primer für quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

In der nachfolgenden Tabelle sind die verwendeten Primer für die quantitative Real-Time PCR aufgelistet (Tabelle 7).

Tabelle 7: Primer für qRT-PCR. *EPO*, *FEZ1*, *HIPK1*, *PAX3*, *RASAL1*, *RELAXIN3* vom Hersteller Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland.

Gen	Oligoname	Sequenz (5' -> 3')	Ta °C	Primerlänge (Basenpaare)
<i>EPO</i>	hEPOMeDIPxsF1	gagatggggtttaccatgttgcc	66	25
	hEPOMeDIPxsR1	gccaggcgtaggccgggcgcgg	66	22
<i>FEZ1</i>	hFEZMeDIPF1	cccacaacaggccacaatagag	64	22
	hFEZMeDIPR1	cccaattactcgggaggctgag	64	22
<i>HIPK1</i>	hHIPK1MeDIPF1	cccacggcggcaatgggagac	64	21
	hHIPK1MeDIPR1	gcctagcagaggagcttactgcc	64	24
<i>PAX3</i>	hPAX3MeDIPF1	cttgaagcccagaagtcattg	60	21
	hPAX3MeDIPR1	gccagccccgcgctctgcactgc	60	23
<i>RASAL1</i>	hRASALMeDIPxs1F2	gccacctcaccaggagccagcggcc	69	25
	hRASALMeDIPxs1R2	ctaccggcaccctcagtcgctgc	69	23
<i>RELAXIN3</i>	hRELAXIN3MeDIPF1	gggtgctgaccggggagctgtgg	63	23
	hRELAXIN3MeDIPR1	gggcaggtgtccctggctgaatgtg	63	25

### 2.1.8 Patientenkollektiv

Für die Erstellung des Patientenkollektivs ist jeweils im Rahmen der venösen Routineblutabnahme ein 7 ml großes EDTA-Blutröhrchen in der Universitätsmedizin Göttingen abgenommen worden. Grundlegende Voraussetzungen für die Teilnahme an der Studie waren die Volljährigkeit und die Einverständniserklärung des Patienten<sup>1</sup>. Als Ausschlusskriterien galten die Ablehnung der Studie durch den Patienten, eine fehlende Einwilligungsfähigkeit oder Umstände, welche die Messungen oder deren Auswertungen störten. Weitere Ausschlusskriterien bestanden nicht. Eine Hospitalisierung oder eine Verlängerung der Hospitalisierung des Patienten war nicht erforderlich.

<sup>1</sup> Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird die männliche Form im Folgenden benutzt. Damit können allerdings sowohl männliche als auch weibliche Patienten gleichermaßen gemeint sein.

Die Zustimmung der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen bezüglich der Untersuchung und des Umgangs mit den Blutproben liegt vor (Antragsnummer DOK\_24\_2015). Das Patientenkollektiv beinhaltete 43 Patientenproben (Tabelle A.1 im Anhang). Als Vergleichs- bzw. Korrelationsparameter sind Alter, Geschlecht<sup>2</sup>, Laborwerte wie Plasmakreatinin<sup>3</sup>, eGFR<sup>4</sup>, Harnstoff-N, Hämoglobin, Leukozyten, CRP sowie sofern vorliegend die kardiologische Grunderkrankung verwendet und retrospektiv ausgewertet worden. Die genannten Laborparameter wurden aus dem Routinelabor vom selben Tag, oder mit maximal einem Tag Abweichung, erhoben. Inhomogene Messwerte der Triplikate eines Patienten wurden ausgeschlossen.

---

<sup>2</sup> Die Geschlechtertrennung erfolgte lediglich nach männlichem und weiblichem Geschlecht, ohne dass an dieser Stelle weitere Geschlechteridentitäten erfasst worden sind.

<sup>3</sup> Verwendet wurde der Laborparameter des Plasmakreatinins aus der Routineblutabnahme. In den erstellten Graphen wird nachfolgend das Plasmakreatinin als Kreatinin beschrieben.

<sup>4</sup> Berechnete GFR (MDRD-Formel, IDMS standardisiert) mit Richtwert  $> 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ ; aus Gründen der besseren Lesbarkeit im Folgenden als eGFR mit der Einheit ml/min angegeben.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolation peripherer Blutlymphozyten

Für die Separation der Blutprobe in Lymphozyten, Plasma und Erythrozyten wurden 7 ml EDTA Blut in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und dazu 10 ml steriles Dulbecco's PBS hinzugefügt. Der Inhalt aus diesem 50 ml-Röhrchen wurde langsam mit einer 10 ml-Pipette in ein zweites 50 ml-Röhrchen pipettiert, in dem sich bereits 8 ml Lymphozytenseparationsmedium befanden. Es ergaben sich zwei Phasen. Die Probe wurde anschließend für 30 Minuten ohne Bremse bei 2500 Umdrehungen/Minute (U/Minute) zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der entstandene Lymphozytenring mit einer 10 ml-Pipette aufgenommen und in einem neuen Röhrchen bis 15 ml mit sterilem Dulbecco's PBS aufgefüllt. Die Lymphozyten samt PBS wurden geschwenkt und dann ein weiteres Mal für 10 Minuten mit Bremse bei 1200 U/Minute zentrifugiert, bevor das PBS bis zum Pellet abpipettiert und verworfen wurde. Das Pellet wurde anschließend erneut in 900 µl Dulbecco's PBS gelöst, in ein 1,5 ml-Safe-lock-Röhrchen überführt und wiederum für 2 Minuten bei 12000 U/Minute zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand verworfen. Die nachfolgenden Schritte zur weiteren Extraktion erfolgten mithilfe des Kitsystems „DNeasy Blood & Tissue Kit“ von Qiagen. Dem Pellet wurden hier nach 200 µl PBS, 20 µl Proteinase K und 200 µl AL-Puffer gemäß dem Herstellerprotokoll des Kitsystems hinzugefügt. Danach wurde die Probe bei 56 °C für mindestens 10 Minuten mittels Mixing Block und nachfolgend mittels Vortex vermischt, anschließend zusammen mit 200 µl Ethanol (99,8 %) auf eine Säule gegeben und bei 8000 U/Minute zentrifugiert. Durch die Zugabe von jeweils 500 µl AW1 und AW2-Waschpuffer sowie erneutes Zentrifugieren bei 8000 bzw. 13500 U/Minute für 1 bis 3 Minuten wurde die Probe auf einer Kieselsäule gebunden und gereinigt. Am Ende wurde das Exempel in 100 µl nukleasefreiem Wasser durch Zentrifugation eluiert und die Konzentration photometrisch bei 260/280 Nanometer (nm) mit dem NanoDrop 2000 Spectrophotometer gemessen.

### 2.2.2 Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP)

Die MeDIP-Methode ist auf eine Abspaltung und Anreicherung methylierter DNA-Fragmente durch Bindung eines Antikörpers an 5-Methylcytosin ausgerichtet und erfolgte, um die unterschiedlichen Methylierungswerte in der anschließenden quantitativen Real-Time PCR gezielter messen und vergleichen zu können. Verwendet wurde das Kitsystem „Methylamp Methylated DNA Capture Kit“ von Epigentek.

Jede aus dem Kapitel 2.2.1 gewonnene DNA-Probe wurde mit dem MC2-Reaktionspuffer aus dem Kitsystem aufgefüllt (Konzentration 1 µg DNA/200 µl). Nachfolgend wurden die DNA-

Stränge mit Hilfe des Sonicatorgerätes gespalten und jede Probe 2 Minuten bei 95 °C erhitzt, um die DNA zu denaturieren und auf diese Weise eine spätere Bindung der DNA-Fragmente an den Antikörper zu ermöglichen. Die Probe wurde nach der Erhitzung sofort auf Eis gestellt, damit die DNA-Einzelstränge sich nicht wieder zusammenlagern konnten.

Als Nächstes wurden die Proben auf eine vorbereitete Probenplatte (*96-Well Plate*) pipettiert. Die Vorbereitung der Probenplatte bestand zuvor darin, in jede Vertiefung (*Well*) der Platte 100 µl MC1-Antikörperpuffer sowie 1 µl anti-5-Methylcytosin als Antikörper zu pipettieren und mit Paraffin abgedeckt für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren zu lassen. Nach 60 Minuten wurde die Flüssigkeit von 101 µl MC1-Antikörperpuffer/anti-5-Methylcytosin verworfen und jedes Well mit zunächst 150 µl MC1-Bindungspuffer sowie mit 150 µl MC3-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 100 µl der fragmentierten und denaturierten DNA pro Well pipettiert, mit Paraffin abgedeckt und für 120 Minuten mittels Belly dancer bei 50-100 U/Minute geschüttelt und inkubiert. Nach der Inkubation wurde jedes Well dreimal für jeweils eine Minute mit 150 µl MC3-Waschpuffer gewaschen.

Ab diesem Schritt wurde nachfolgend für jede DNA-Probe zusätzlich auch ein Input als Kontrollprobe mitbehandelt. Jeweils 5 µl der fragmentierten und denaturierten DNA wurde als Input eingesetzt und als Kontrolle nicht mit anti-5-Methylcytosin behandelt (Verdünnungsfaktor 1:20). Für alle Proben inkl. Input wurden hiernach pro Well 60 µl MC4-DNA-Lösungspuffer und 1 µl Proteinase K angesetzt, wovon in jedes Well 60 µl gegeben wurde und mit einem Deckel verschlossen für 60 Minuten im Wasserbad bei 65 °C eine Inkubation erfolgte. Im Anschluss an diese Inkubation wurde zur Fällung der DNA jedem Well 180 µl Ethanol (99,8 %) hinzugefügt und die Proben jeweils auf eine mit 100 µl MC5-Bindungspuffer vorbereitete Säule gegeben. Nach dem Zentrifugieren bei 12000 U/Minute für 20 Sekunden wurde der Durchfluss verworfen und die Proben zweimal mit 200 µl Ethanol (90 %) gewaschen sowie ein weiteres Mal für 20 bzw. 35 Sekunden bei 12000 U/Minute zentrifugiert. Darauffolgend wurde die Säule in ein neues Safe-look-Röhrchen gesetzt, 20 µl MC6-Auswaschungspuffer auf den Filter gegeben und für 20 Sekunden bei 12000 U/Minute erneut in die Zentrifuge gestellt. Abschließend wurde jede Probe in 80 µl nukleasefreiem Wasser eluiert und letztmalig bei 12000 U/Minute für 30 Sekunden zentrifugiert.

### 2.2.3 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Basis für die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit dem Ziel der Amplifikation der Nukleinsäuren. Zusätzlich ist durch Hinzufügen eines Fluoreszenzfarbstoffes die Quantifizierung doppelsträngiger Moleküle möglich (Higuchi et al. 1992).

Pro Well wurden 5 µl methylierte DNA oder 5 µl Input als Probe aus Kapitel 2.2.2 verwendet. Es wurde jeweils ein Triplet pro Probe pipettiert. Begleitend erfolgte eine Negativkontrolle, um eine Kontamination mit fremder DNA auszuschließen. Zu jeder Probe wurden 15 µl eines vorbereiteten Ansatzes (siehe Tabelle 6, Seite 10) bestehend aus dem jeweiligen Primer (siehe Tabelle 7, Seite 11), nukleasefreiem Wasser und SYBR-Green-Mastermix als Fluoreszenzfarbstoff hinzugefügt. Anschließend wurde die StepOne-Software verwendet, um die DNA-Menge des Zielgens zu detektieren. Das Programm startete initial mit einem Zyklus für 10 Minuten bei 95 °C, danach erfolgte die Amplifikation bei 95 °C über 15 Sekunden, 1 Minute bei der Annealingtemperatur ( $T_a$ ) des Primerpaares und 15 Sekunden bei erneut 95 °C. 40 Zyklen für jeweils 3 Sekunden bei 95 °C und 30 Sekunden bei 60 °C schlossen sich an. Der am Ende vom Softwareprogramm angegebene *cycle threshold* (Ct-Wert) gab die Zyklusanzahl an, bei der der Schwellwert erreicht und ausreichend Fluoreszenzfarbstoff von der DNA gebunden wurde und ist umgekehrt äquivalent zur DNA-Menge des methylierten Gens. Je größer der Zyklus war, desto weniger methylierte DNA war in der Probe vorhanden. Zur Berechnung des  $\Delta Ct$ -Wertes, also der Relation zur Gesamt-DNA, wurde der Ct-Wert der Inputprobe von dem dazugehörigen Ct-Wert der DNA-Probe subtrahiert. Um letztlich die relative DNA-Menge durch die Formel  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  dividiert durch 20 zu berechnen, wurde zuvor der  $\Delta\Delta Ct$ -Wert durch die Subtraktion der  $\Delta Ct$ -Werte der jeweiligen Probe bestimmt.

### 2.2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Herrn PD Dr. med. Björn Tampe (Klinik für Nephrologie und Rheumatologie, Universitätsmedizin Göttingen, Deutschland) und Verwendung der Programme MS Office sowie Prism. Die Ergebnisse wurden nach mindestens dreimaliger Durchführung der Experimente als Mittelwert mit Standardfehler (SEM) und Signifikanzniveau (p-Wert) angegeben, welches mittels studentischen T-Tests ermittelt wurde. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert kleiner 0,05 definiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung von methylierter *RASAL1*-DNA in peripheren Blutlymphozyten

Zunächst erfolgte eine Screeninguntersuchung von methylierten *RASAL1*-DNA-Fragmenten in peripheren Blutlymphozyten (PBL) von Patienten mit eingeschränkter und nicht eingeschränkter Nierenfunktion. Die Nierenfunktion wurde hierbei anhand der geschätzten glomerulären Filtrationsrate (eGFR) in eingeschränkt (eGFR < 60 ml/min) und geringfügig bzw. nicht eingeschränkt (eGFR > 60 ml/min) unterschieden. Die Akkumulation von methylierten *RASAL1*-Promotorfragmenten wurde mittels qRT-PCR analysiert und zeigte signifikant erhöhte Werte methylierter *RASAL1*-DNA in peripheren Blutlymphozyten von Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion (Abbildung 3; Tabelle 8).

Tabelle 8: Screeninganalyse von methylierter *RASAL1*-DNA und der Nierenfunktion. Methylierte *RASAL1*-DNA wurde in Patienten mit einer eGFR < 60 ml/min und einer eGFR > 60 ml/min gemessen.

Gen	Vergleichsparameter	Probenanzahl: eGFR < 60 ml/min	Probenanzahl: eGFR > 60 ml/min	p-Wert
<i>RASAL1</i>	Nierenfunktion	3	3	0,0494

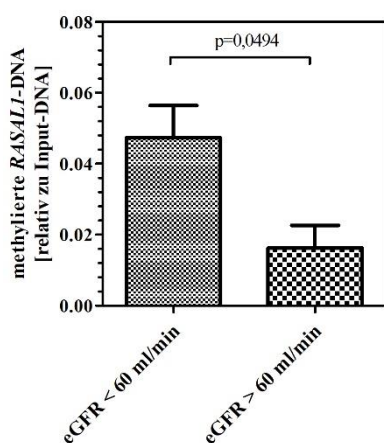


Abbildung 3: Screeninganalyse von methylierter *RASAL1*-DNA und der Nierenfunktion. Methylierte *RASAL1*-DNA in Patienten mit einer eGFR < 60 ml/min (n = 3) und einer eGFR > 60 ml/min (n = 3). (Der Graph zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SEM und den p-Wert.)



## 3.2 Validierung

### 3.2.1 Validierung von methylierter DNA im Kontext der Nierenfunktion

Zur Validierung der Ergebnisse aus Kapitel 3.1 erfolgte in einer größeren Patientenkohorte (n = 43) die Untersuchung von methylierter DNA und der Nierenfunktion in Patienten mit einer eGFR < 60 ml/min und einer eGFR > 60 ml/min für die Gene *RASAL1*, *PAX3*, *FEZ1*, *HIPK1* und *RELAXIN3* (Abbildung 4 A-E; Tabelle 9). Hierbei zeigte sich vor allem für *RASAL1* ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Methylierungswerte beider Vergleichsgruppen, indem Patienten mit einer eGFR < 60 ml/min ein deutlich erhöhtes Methylierungslevel der DNA-Promotorfragmente aufwiesen (Abbildung 4 A).

Tabelle 9: Validierungsanalyse von methylierter DNA und der Nierenfunktion. Methylierte *RASAL1*-DNA wurde in Patienten mit einer eGFR < 60 ml/min und einer eGFR > 60 ml/min gemessen.

Gen	Vergleichsparameter	Probenanzahl: eGFR < 60 ml/min	Probenanzahl: eGFR > 60 ml/min	p-Wert
<i>RASAL1</i>	Nierenfunktion	20	23	0,0064
<i>PAX3</i>	Nierenfunktion	20	23	0,1070
<i>FEZ1</i>	Nierenfunktion	18	22	0,6656
<i>HIPK1</i>	Nierenfunktion	20	23	0,4120
<i>RELAXIN3</i>	Nierenfunktion	20	23	0,1063

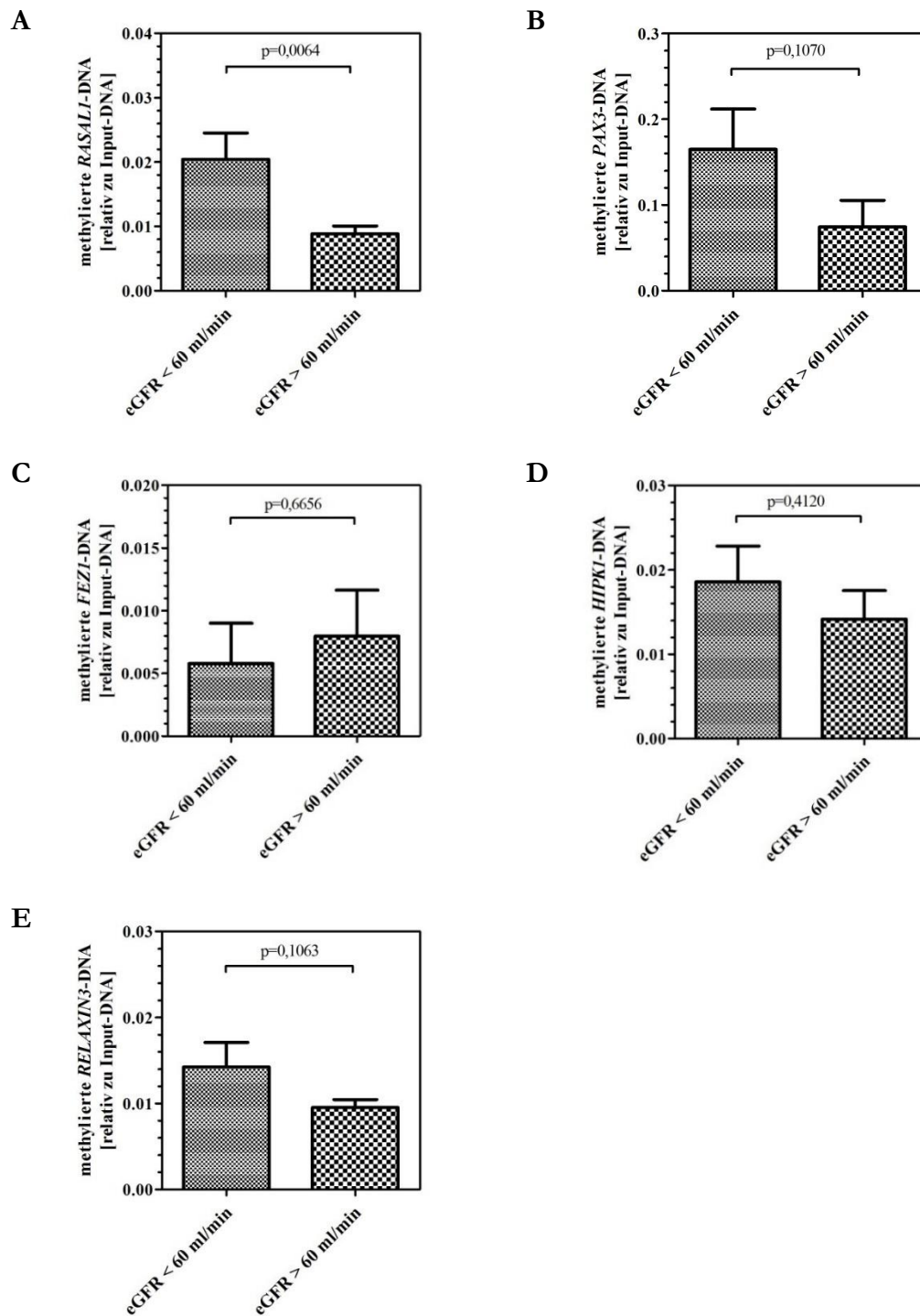


Abbildung 4: Validierungsanalyse von methylierter DNA und der Nierenfunktion. (A) Methylierte *RASAL1*-DNA in Patienten mit einer eGFR < 60 ml/min (n = 20) zu einer eGFR > 60 ml/min (n = 23). (B) Methylierte *PAX3*-DNA in Patienten mit einer eGFR < 60 ml/min (n = 20) zu einer eGFR > 60 ml/min (n = 23). (C) Methylierte *FEZ1*-DNA in Patienten mit einer eGFR < 60 ml/min (n = 18) zu einer eGFR > 60 ml/min (n = 22). (D) Methylierte *HIPK1*-DNA in Patienten mit einer eGFR < 60 ml/min (n = 20) zu einer eGFR > 60 ml/min (n = 23). (E) Methylierte *RELAXIN3*-DNA in Patienten mit einer eGFR < 60 ml/min (n = 20) zu einer eGFR > 60 ml/min (n = 23). (Die Graphen zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM und den p-Wert.)

### 3.2.2 Korrelationen von methylierter DNA, Leukozyten und Entzündungswerten

In den Kapiteln 3.1 und 3.2.1 gelang der Nachweis von methylierter DNA in menschlichen PBL. PBL stellen eine Untergruppe der Leukozyten dar. Um zu klären, inwieweit daher eine unterschiedliche Leukozytenzahl oder eine Induktion der Leukozytenproduktion im Rahmen einer Entzündungsreaktion Einfluss auf das Methylierungslevel der DNA hat, erfolgten Korrelationsanalysen von methylierten DNA-Fragmenten zur Leukozytenzahl sowie von methylierten DNA-Fragmenten zum C-reaktiven Protein (CRP). Die Untersuchungen erfolgten mittels qRT-PCR für die Gene *RASAL1*, *PAX3*, *FEZ1*, *HIPK1* und *RELAXIN3* in menschlichen PBL aller Patienten, bei denen Leukozytenzahl und CRP-Wert bekannt waren. Für alle Gene zeigten sich keine signifikanten Korrelationen von methylierter DNA zur Leukozytenzahl (Abbildung 5 A-E; Tabelle 10) oder zum CRP-Wert (Abbildung 6 A-E; Tabelle 11).

Tabelle 10: Analyse von methylierter DNA in Korrelation zur Leukozytenzahl.

Gen	Korrelationsparameter	Probenanzahl	p-Wert	r <sup>2</sup>	Steigung
<i>RASAL1</i>	Leukozyten	39	0,3048	0,02844	0,0006898 ± 0,0006628
<i>PAX3</i>	Leukozyten	39	0,8718	0,0007128	0,001392 ± 0,008569
<i>FEZ1</i>	Leukozyten	36	0,7215	0,003785	0,0002739 ± 0,0007621
<i>HIPK1</i>	Leukozyten	39	0,1880	0,04638	0,001057 ± 0,0007884
<i>RELAXIN3</i>	Leukozyten	39	0,5424	0,01011	0,0002763 ± 0,0004495

Tabelle 11: Analyse von methylierter DNA in Korrelation zum CRP.

Gen	Korrelationsparameter	Probenanzahl	p-Wert	r <sup>2</sup>	Steigung
<i>RASAL1</i>	CRP	31	0,9983	0,000000153	-0,0000001346 ± 0,00006372
<i>PAX3</i>	CRP	31	0,6992	0,005223	-0,0003215 ± 0,0008239
<i>FEZ1</i>	CRP	28	0,0881	0,1078	0,0001423 ± 0,00008030
<i>HIPK1</i>	CRP	31	0,7352	0,004004	-0,00002410 ± 0,00007059
<i>RELAXIN3</i>	CRP	31	0,3567	0,02936	0,00004188 ± 0,00004471

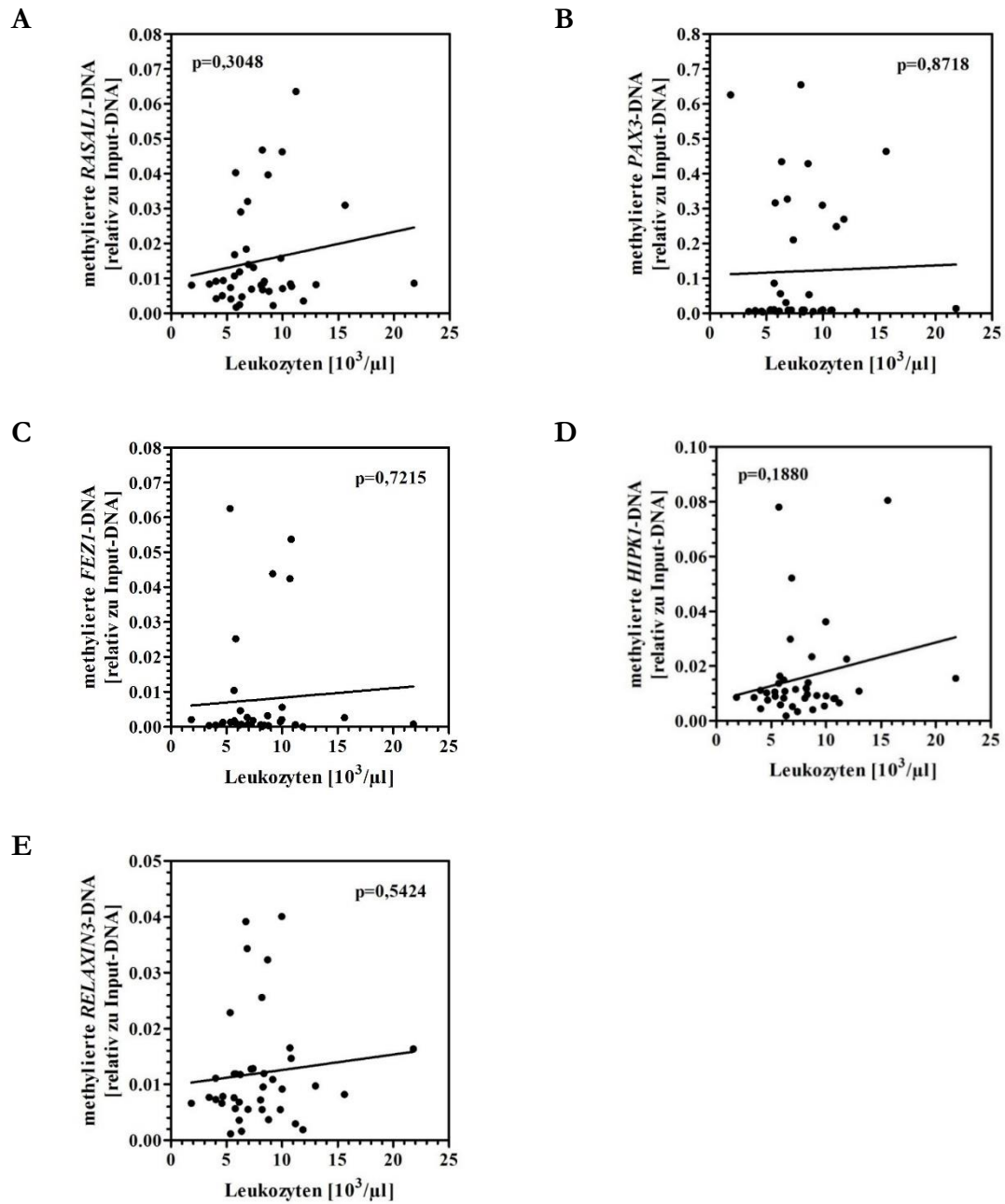


Abbildung 5: Korrelationen von methylierter DNA zur Leukozytenzahl. (A) Methylierte *RASAL1*-DNA in Korrelation zu Leukozyten ( $n = 39$ ). (B) Methylierte *PAX3*-DNA in Korrelation zu Leukozyten ( $n = 39$ ). (C) Methylierte *FEZ1*-DNA in Korrelation zu Leukozyten ( $n = 36$ ). (D) Methylierte *HIPK1*-DNA in Korrelation zu Leukozyten ( $n = 39$ ). (E) Methylierte *RELAXIN3*-DNA in Korrelation zu Leukozyten ( $n = 39$ ). (Die Graphen zeigen lineare Regressionsanalysen samt p-Wert.)

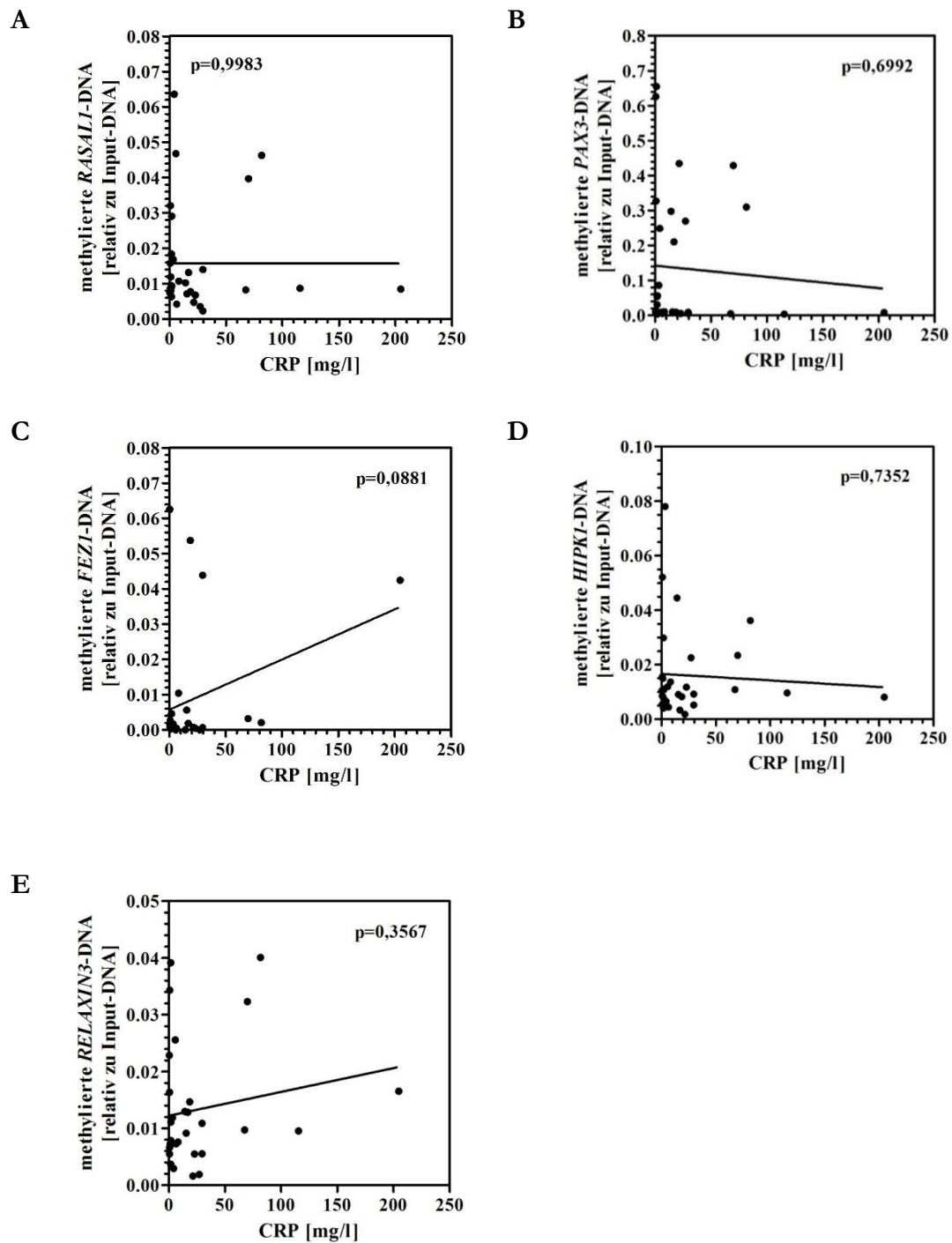


Abbildung 6: Korrelationen von methylierter DNA zum CRP. (A) Methylierte *RASAL1*-DNA in Korrelation zum CRP (n = 31). (B) Methylierte *PAX3*-DNA in Korrelation zum CRP (n = 31). (C) Methylierte *FEZ1*-DNA in Korrelation zum CRP (n = 28). (D) Methylierte *HIPK1*-DNA in Korrelation zum CRP (n = 31). (E) Methylierte *RELAXIN3*-DNA in Korrelation zum CRP (n = 31). (Die Graphen zeigen lineare Regressionsanalysen samt p-Wert.)

### 3.2.3 Korrelationen von methylierter DNA und allgemeinen Patientencharakteristika

Das Patientenkollektiv ( $n = 43$ ) bestand sowohl aus männlichen ( $n = 28$ ) als auch aus weiblichen ( $n = 15$ ) Patienten. Ebenso stammten die Probanden aus verschiedenen Altersklassen. Um eine Abhängigkeit der Methylierungswerte von grundlegenden, allgemeinen Patientencharakteristika beurteilen zu können, erfolgten Analysen von methylierten DNA-Fragmenten und dem Patientenalter bzw. dem Geschlecht. In den folgenden Untersuchungen zeigten sich für die Gene *RASAL1*, *PAX3*, *FEZ1*, *HIPK1* und *RELAXIN3* jeweils keine signifikanten Zusammenhänge zwischen methylierter DNA und dem Alter (Abbildung 7 A-E; Tabelle 12) oder methylierter DNA und dem Geschlecht (Abbildung 8 A-E; Tabelle 13).

Tabelle 12: Analyse von methylierter DNA in Korrelation zum Alter.

Gen	Korrelationsparameter	Probenanzahl	p-Wert	r <sup>2</sup>	Steigung
<i>RASAL1</i>	Alter	43	0,3531	0,02106	0,0001302 ± 0,0001386
<i>PAX3</i>	Alter	43	0,0693	0,07821	-0,003223 ± 0,001728
<i>FEZ1</i>	Alter	40	0,1655	0,04999	0,0002149 ± 0,0001520
<i>HIPK1</i>	Alter	43	0,3307	0,02309	-0,0001668 ± 0,0001694
<i>RELAXIN3</i>	Alter	43	0,1016	0,06402	0,0001515 ± 0,00009047

Tabelle 13: Analyse von methylierter DNA und dem Geschlecht.

Gen	Vergleichsparameter	Probenanzahl: Männlich	Probenanzahl: Weiblich	p-Wert
<i>RASAL1</i>	Geschlecht	28	15	0,8842
<i>PAX3</i>	Geschlecht	28	15	0,4836
<i>FEZ1</i>	Geschlecht	25	15	0,5959
<i>HIPK1</i>	Geschlecht	28	15	0,7019
<i>RELAXIN3</i>	Geschlecht	28	15	0,2858

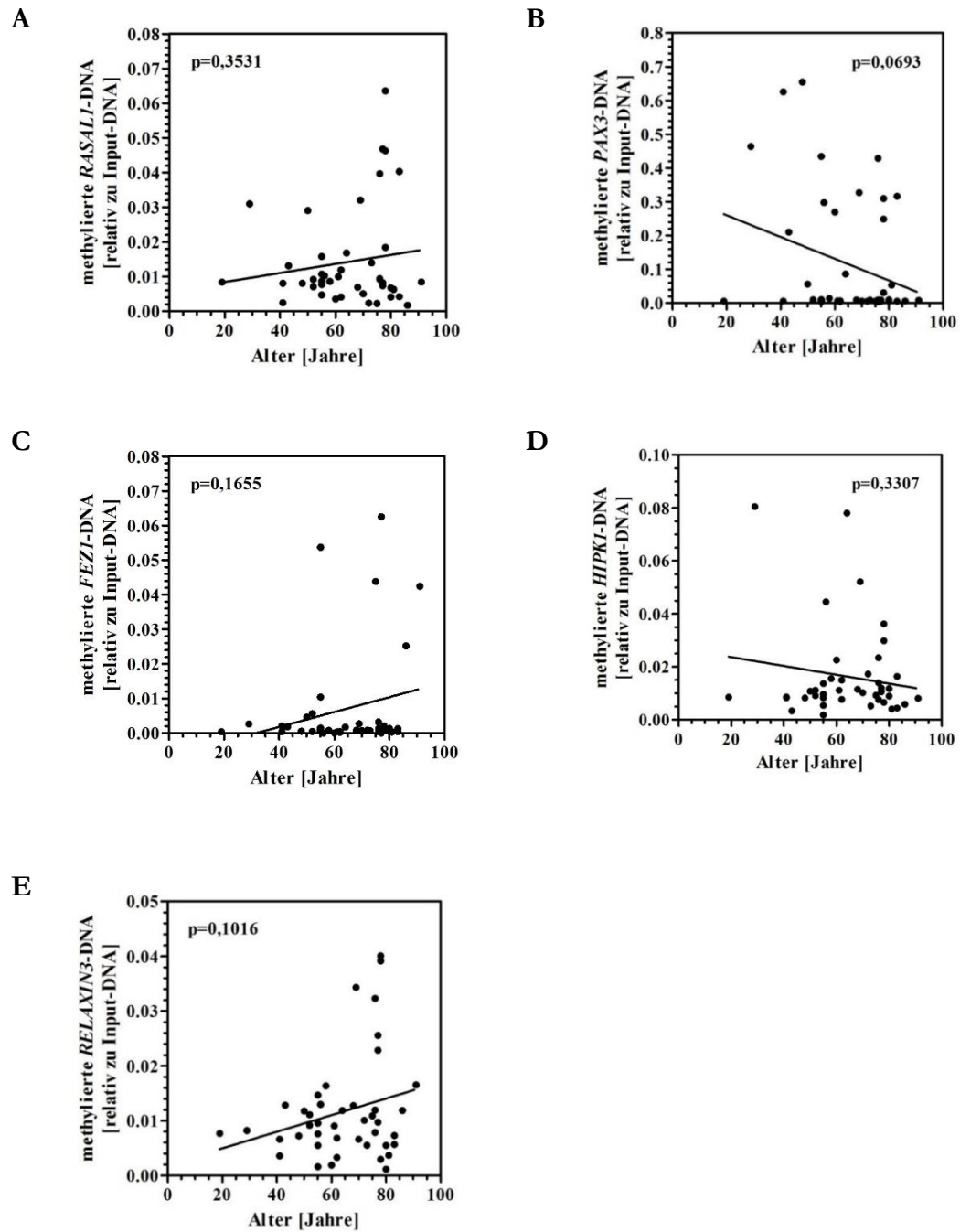


Abbildung 7: Korrelationen von methylierter DNA zum Alter. (A) Methylierte *RASAL1*-DNA in Korrelation zum Alter ( $n = 43$ ). (B) Methylierte *PAX3*-DNA in Korrelation zum Alter ( $n = 43$ ). (C) Methylierte *FEZ1*-DNA in Korrelation zum Alter ( $n = 40$ ). (D) Methylierte *HIPK1*-DNA in Korrelation zum Alter ( $n = 43$ ). (E) Methylierte *RELAXIN3*-DNA in Korrelation zum Alter ( $n = 43$ ). (Die Graphen zeigen lineare Regressionsanalysen samt p-Wert.)

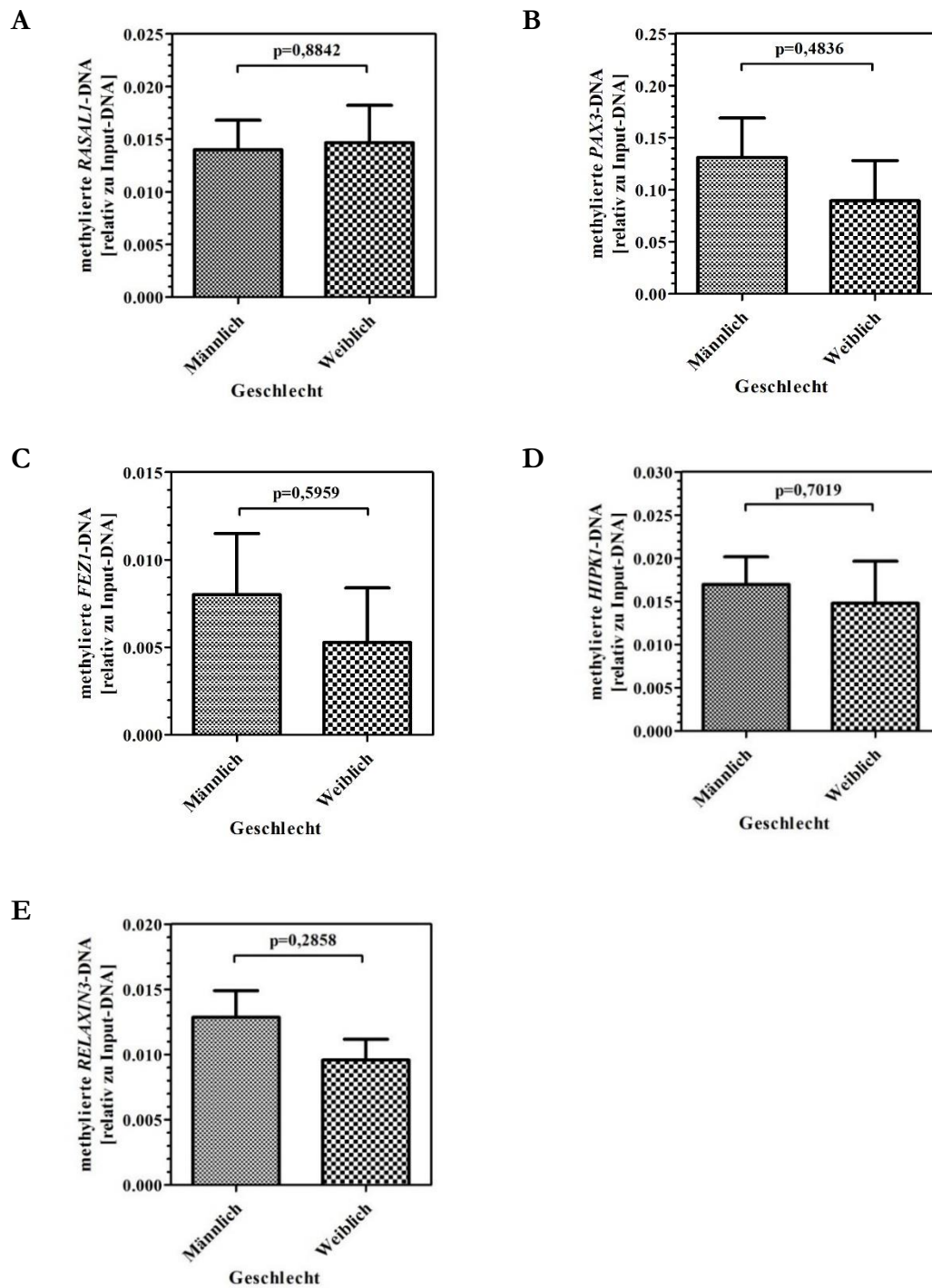


Abbildung 8: Analysen von methylierter DNA und dem Geschlecht. (A) Methylierte *RASAL1*-DNA im männlichen ( $n = 28$ ) zum weiblichen ( $n = 15$ ) Geschlecht. (B) Methylierte *PAX3*-DNA im männlichen ( $n = 28$ ) zum weiblichen ( $n = 15$ ) Geschlecht. (C) Methylierte *FEZ1*-DNA im männlichen ( $n = 25$ ) zum weiblichen ( $n = 15$ ) Geschlecht. (D) Methylierte *HIPK1*-DNA im männlichen ( $n = 28$ ) zum weiblichen ( $n = 15$ ) Geschlecht. (E) Methylierte *RELAXIN3*-DNA im männlichen ( $n = 28$ ) zum weiblichen ( $n = 15$ ) Geschlecht. (Die Graphen zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM und den p-Wert.)



### 3.2.4 Korrelationen von methylierter DNA und Nierenretentionsparametern

Um die Analysen bezüglich der Nierenfunktion aus den Kapiteln 3.1 und 3.2.1 genauer zu charakterisieren, schlossen sich Korrelationsanalysen hinsichtlich der einzelnen Nierenretentionsparameter Plasmakreatinin, eGFR und Harnstoff-N für die Gene *RASAL1*, *PAX3*, *FEZ1*, *HIPK1* und *RELAXIN3* an (Abbildung 9 A-E; Abbildung 10 A-E; Abbildung 11 A-E; Tabelle 14; Tabelle 15; Tabelle 16). Die korrelativen Analysen zeigten, dass eine zunehmende Nierenfunktionseinschränkung (Anstieg Plasmakreatinin und Harnstoff-N, eGFR-Abfall) mit einer Akkumulation von methylierter *RASAL1*-DNA (Abbildung 9 A; Abbildung 10 A; Abbildung 11 A) assoziiert ist. Auch methylierte *PAX3*-DNA und methylierte *RELAXIN3*-DNA akkumulierten jeweils bei ansteigendem Plasmakreatinin und abfallender eGFR (Abbildung 9 B, E; Abbildung 10 B, E). Bezüglich dem Parameter Harnstoff-N waren die Ergebnisse für die Gene *PAX3* und *RELAXIN3* weniger deutlich, ebenso insgesamt für die übrigen Gene *FEZ1* und *HIPK1* (Abbildung 9 C-D; Abbildung 10 C-D; Abbildung 11 B-E).

Tabelle 14: Analyse von methylierter DNA in Korrelation zum Kreatinin.

Gen	Korrelationsparameter	Probenanzahl	p-Wert	r <sup>2</sup>	Steigung
<i>RASAL1</i>	Kreatinin	43	0,0016	0,2170	0,008642 ± 0,002563
<i>PAX3</i>	Kreatinin	43	0,0240	0,1182	0,08194 ± 0,03494
<i>FEZ1</i>	Kreatinin	40	0,7224	0,003359	0,001132 ± 0,003163
<i>HIPK1</i>	Kreatinin	43	0,6240	0,005916	0,001745 ± 0,003534
<i>RELAXIN3</i>	Kreatinin	43	0,0559	0,08626	0,003636 ± 0,001848

Tabelle 15: Analyse von methylierter DNA in Korrelation zur eGFR.

<b>Gen</b>	<b>Korrelationsparameter</b>	<b>Probenanzahl</b>	<b>p-Wert</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>Steigung</b>
<i>RASAL1</i>	eGFR	43	< 0,0001	0,3216	-0,0005486 ± 0,0001244
<i>PAX3</i>	eGFR	43	0,0085	0,1570	-0,004924 ± 0,001782
<i>FEZ1</i>	eGFR	40	0,7751	0,002173	0,00004780 ± 0,0001662
<i>HIPK1</i>	eGFR	43	0,4943	0,01147	-0,0001267 ± 0,0001837
<i>RELAXIN3</i>	eGFR	43	0,0592	0,08412	-0.0001872 ± 0.00009649

Tabelle 16: Analyse von methylierter DNA in Korrelation zum Harnstoff-N.

<b>Gen</b>	<b>Korrelationsparameter</b>	<b>Probenanzahl</b>	<b>p-Wert</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>Steigung</b>
<i>RASAL1</i>	Harnstoff-N	31	0,0005	0,3484	0,0003866 ± 0,00009818
<i>PAX3</i>	Harnstoff-N	31	0,2276	0,04979	0,001995 ± 0,001619
<i>FEZ1</i>	Harnstoff-N	29	0,7650	0,003365	0,00003044 ± 0,0001008
<i>HIPK1</i>	Harnstoff-N	31	0,8499	0,001256	-0,00003041 ± 0,0001592
<i>RELAXIN3</i>	Harnstoff-N	31	0,1108	0,08535	0.0001164 ± 0.00007075

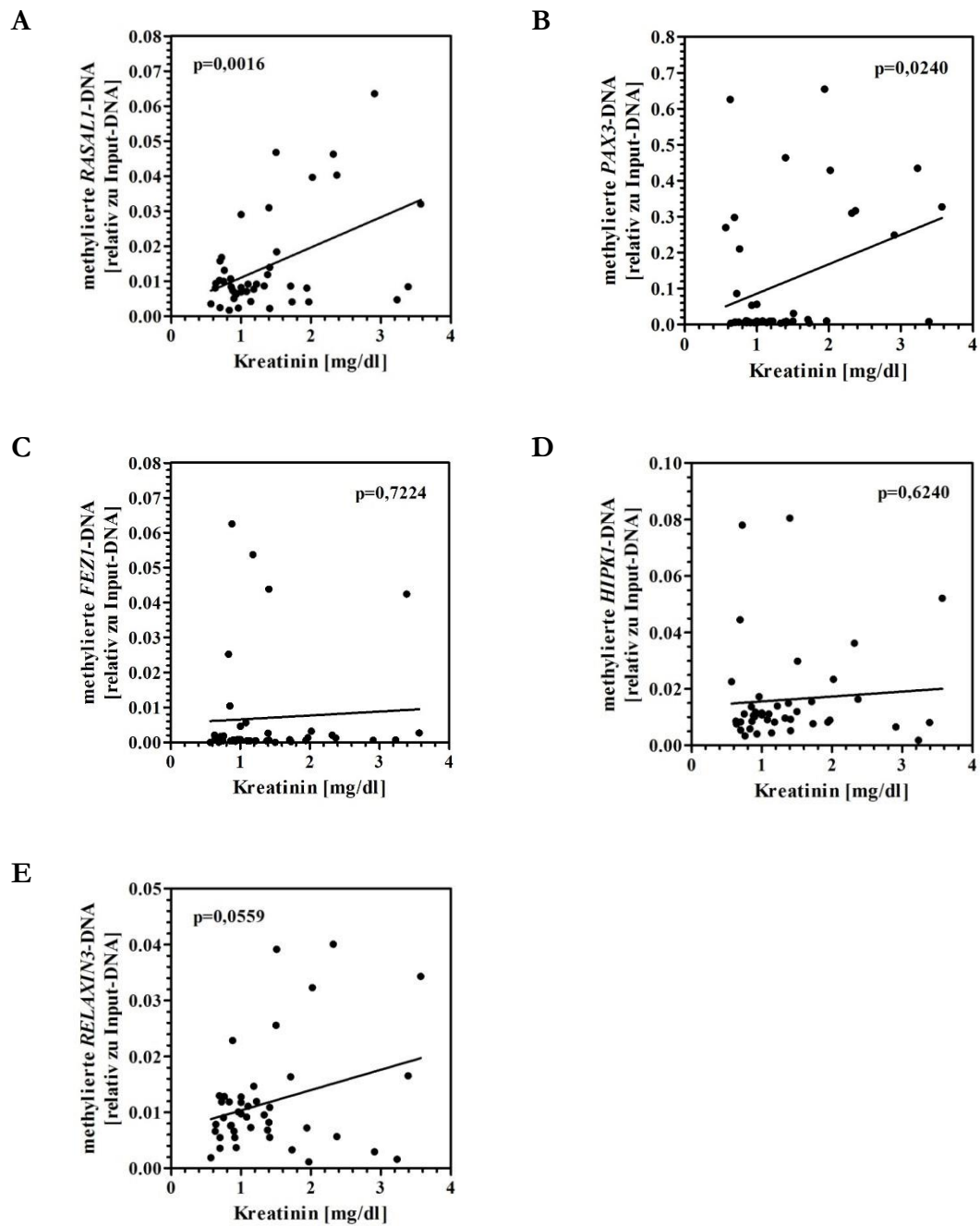


Abbildung 9: Korrelationen von methylierter DNA zum Kreatinin. (A) Methylierte *RASAL1*-DNA in Korrelation zum Kreatinin (n = 43). (B) Methylierte *PAX3*-DNA in Korrelation zum Kreatinin (n = 43). (C) Methylierte *FEZ1*-DNA in Korrelation zum Kreatinin (n = 40). (D) Methylierte *HIPK1*-DNA in Korrelation zum Kreatinin (n = 43). (E) Methylierte *RELAXIN3*-DNA in Korrelation zum Kreatinin (n = 43). (Die Graphen zeigen lineare Regressionsanalysen samt p-Wert.)

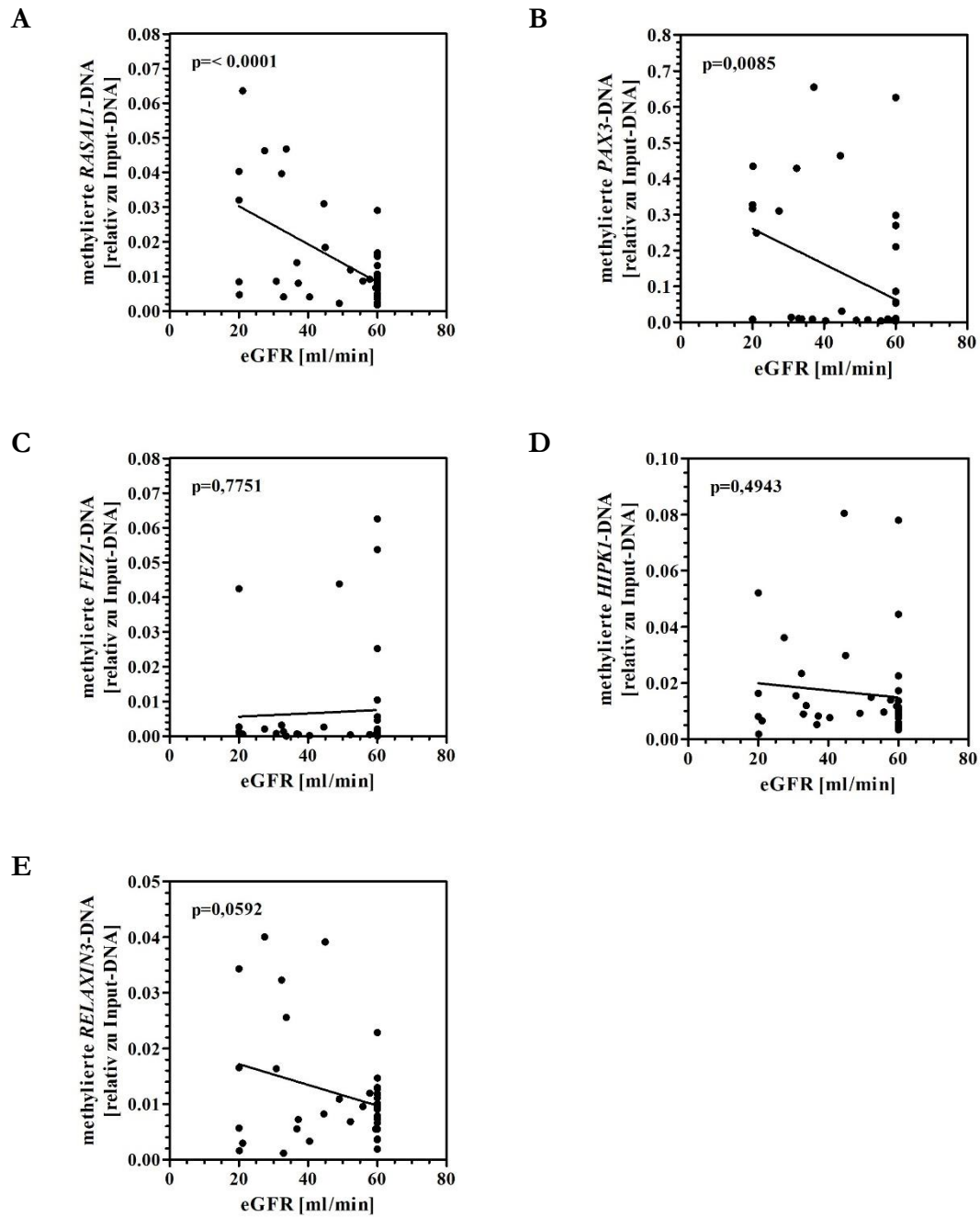


Abbildung 10: Korrelationen von methylierter DNA zur eGFR. (A) Methylierte *RASAL1*-DNA in Korrelation zur eGFR (n = 43). (B) Methylierte *PAX3*-DNA in Korrelation zur eGFR (n = 43). (C) Methylierte *FEZ1*-DNA in Korrelation zur eGFR (n = 40). (D) Methylierte *HIPK1*-DNA in Korrelation zur eGFR (n = 43). (E) Methylierte *RELAXIN3*-DNA in Korrelation zur eGFR (n = 43). (Die Graphen zeigen lineare Regressionsanalysen samt p-Wert.)

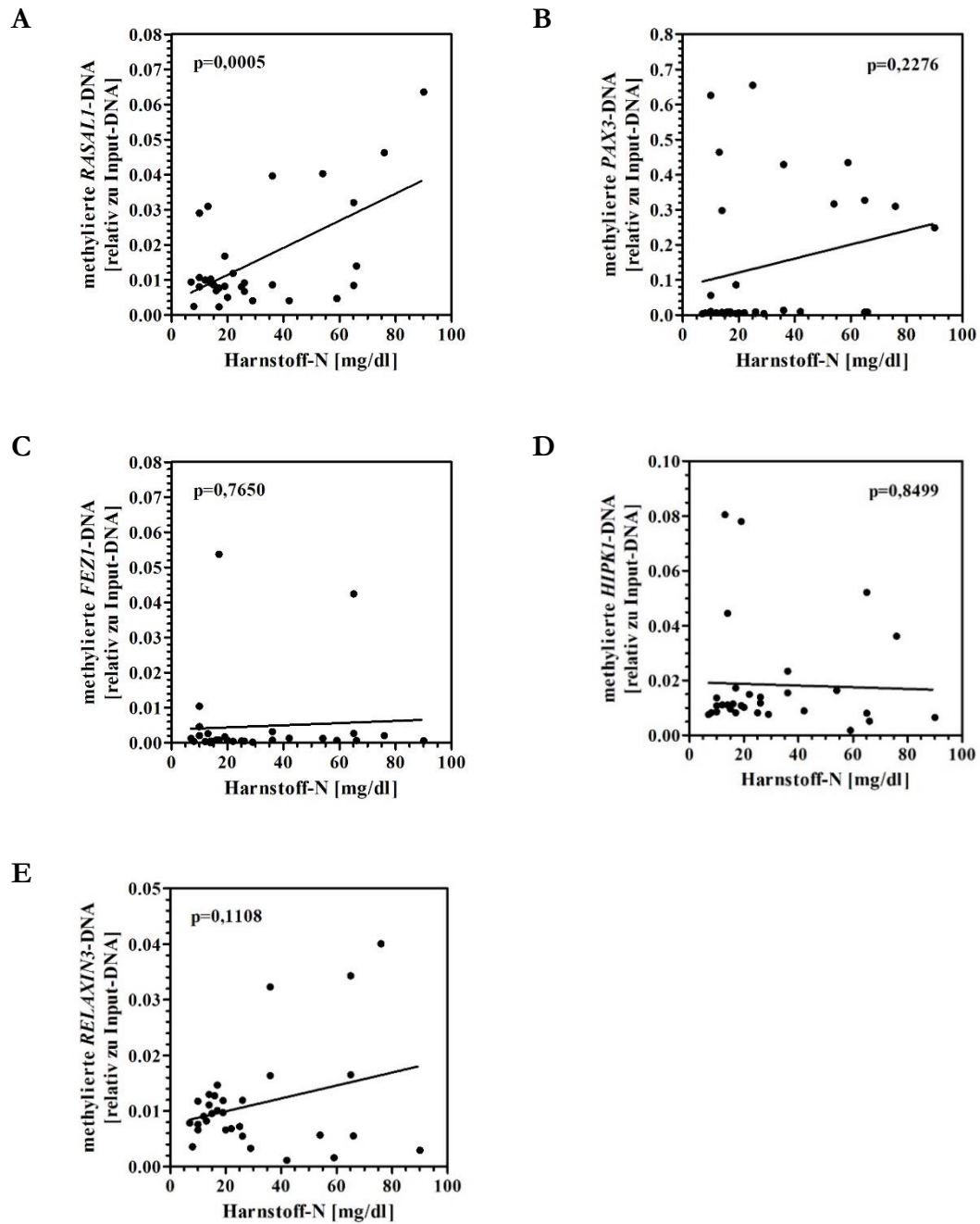


Abbildung 11: Korrelationen von methylierter DNA zum Harnstoff-N. (A) Methylierte *RASAL1*-DNA in Korrelation zum Harnstoff-N ( $n = 31$ ). (B) Methylierte *PAX3*-DNA in Korrelation zum Harnstoff-N ( $n = 31$ ). (C) Methylierte *FEZ1*-DNA in Korrelation zum Harnstoff-N ( $n = 29$ ). (D) Methylierte *HIPK1*-DNA in Korrelation zum Harnstoff-N ( $n = 31$ ). (E) Methylierte *RELAXIN3*-DNA in Korrelation zum Harnstoff-N ( $n = 31$ ). (Die Graphen zeigen lineare Regressionsanalysen samt p-Wert.)

### 3.3 Analysen von methylierter *EPO*-DNA

Im Rahmen einer Niereninsuffizienz ist gehäuft das Auftreten einer Anämie mit erniedrigten Erythropoetintitern im Blut beobachtet worden (Erslev und Besarab 1997). Als Basisuntersuchung erfolgte in diesem Rahmen zunächst eine Korrelationsanalyse von methylierter *RASAL1*-DNA und den Hämoglobinwerten der gesamten Patientenkohorte. Hier zeigte sich eine Akkumulation von methylierter *RASAL1*-DNA bei niedrigem Hämoglobin (Abbildung 12 A; Tabelle 17). Anschließend schlossen sich Untersuchungen hinsichtlich methylierter *EPO*-DNA und Hämoglobinwerten an. In den Korrelationsanalysen aller Proben, bei denen ein Hämoglobinwert vorlag, wurden die Patienten zunächst unabhängig vom Ausmaß ihrer Nierenfunktions Einschränkung berücksichtigt. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang (Abbildung 12 B). In der differenzierten, korrelativen Betrachtung von Hämoglobinwerten und methylierter *EPO*-DNA in Patienten mit einem Kreatininwert von mindestens  $> 1,5$  mg/dl ( $n = 9$ ) ließ sich eine Akkumulation methylierter *EPO*-DNA bei niedrigen Hämoglobinwerten signifikant nachweisen (Abbildung 12 C). Es erfolgten weitere Analysen, in denen Nierenretentionsparameter und allgemeine Patientencharakteristika als Korrelationsparameter untersucht wurden. Ein Einfluss der allgemeinen Patientencharakteristika (Alter, Geschlecht) erschien in den korrelativen Analysen unwahrscheinlich, ebenso stellte sich bezüglich der Leukozytenzahl oder -induktion durch entzündliche Prozesse in den erhobenen Daten kein signifikanter Zusammenhang zu methylierter *EPO*-DNA dar (Abbildung 13 A-B; Abbildung 14 A-B; Tabelle 18). Hinsichtlich der Nierenfunktion und der Nierenretentionsparameter (Plasmakreatinin, eGFR, Harnstoff-N) ergaben sich für die heterogene Patientenkohorte keine signifikanten Akkumulationen methylierter *EPO*-DNA (Abbildung 15 A-D).

Tabelle 17: Korrelation von methylierter *RASAL1*-DNA zum Hämoglobin.

Gen	Korrelationsparameter	Probenanzahl	p-Wert	$r^2$	Steigung
<i>RASAL1</i>	Hämoglobin	39	0,0122	0,1581	$-0.002664 \pm 0.001011$

Tabelle 18: Analyse von methylierter *EPO*-DNA.

<b>Gen</b>	<b>Korrelations-/ Vergleichspa- rameter</b>	<b>Probenanzahl</b>	<b>p-Wert</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>Steigung</b>
<i>EPO</i>	Hämoglobin	36	0,1412	0,06257	0,002162 ± 0,001435
<i>EPO</i>	Hämoglobin	Kreatininwert >1,5 mg/dl: 9	0,0344		
<i>EPO</i>	Alter	40	0,2511	0,03451	0,0002245 ± 0,0001927
<i>EPO</i>	Geschlecht	Männlich: 25 Weiblich: 15	0,4375		
<i>EPO</i>	Nierenfunktion	eGFR < 60 ml/min: 18 eGFR > 60 ml/min: 22	0,5187		
<i>EPO</i>	Kreatinin	40	0,9979	0,000000 1871	0,00001106 ± 0,004146
<i>EPO</i>	eGFR	40	0,6788	0,004561	0,00008989 ± 0,0002154
<i>EPO</i>	Harnstoff-N	30	0,8200	0,001880	- 0,00004080 ± 0,0001777
<i>EPO</i>	Leukozyten	36	0,5150	0,01257	0,0005940 ± 0,0009028
<i>EPO</i>	CRP	28	0,7298	0,004665	0,00003295 ± 0,00009439

Als Korrelations-/Vergleichsparameter wurden das Alter, das Geschlecht, eine eingeschränkte (eGFR < 60 ml/min) und nicht eingeschränkte (eGFR > 60 ml/min) Nierenfunktion sowie Laborparameter wie Kreatinin, eGFR, Harnstoff-N, Leukozyten, CRP und Hämoglobin untersucht.

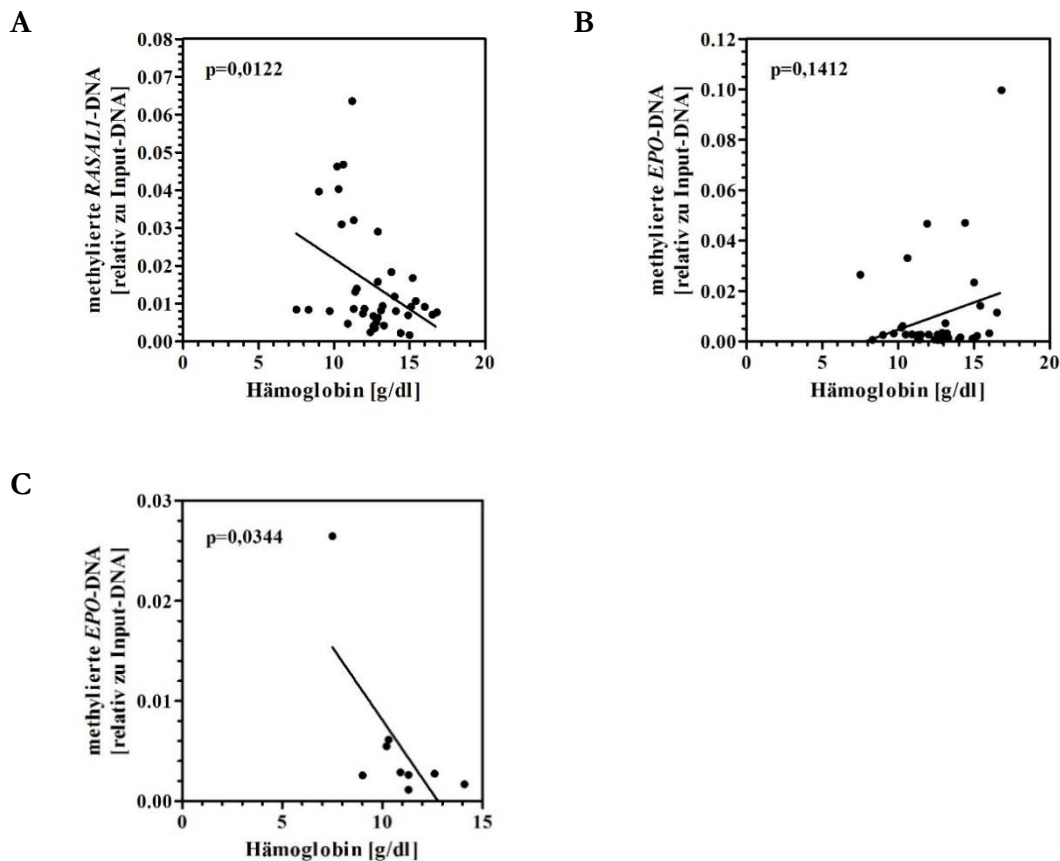


Abbildung 12: Korrelationen von methylierter *RASAL1*- und *EPO*-DNA zum Hämoglobin. (A) Methylierte *RASAL1*-DNA in Korrelation zum Hämoglobin (n = 39). (B) Methylierte *EPO*-DNA in Korrelation zum Hämoglobin unabhängig vom Ausmaß der Nierenfunktionseinschränkung (n = 36). (C) Methylierte *EPO*-DNA in Korrelation zum Hämoglobin bei Patienten mit einem Kreatininwert von mindestens >1,5 mg/dl (n = 9). (Die Graphen zeigen lineare Regressionsanalysen samt p-Wert.)

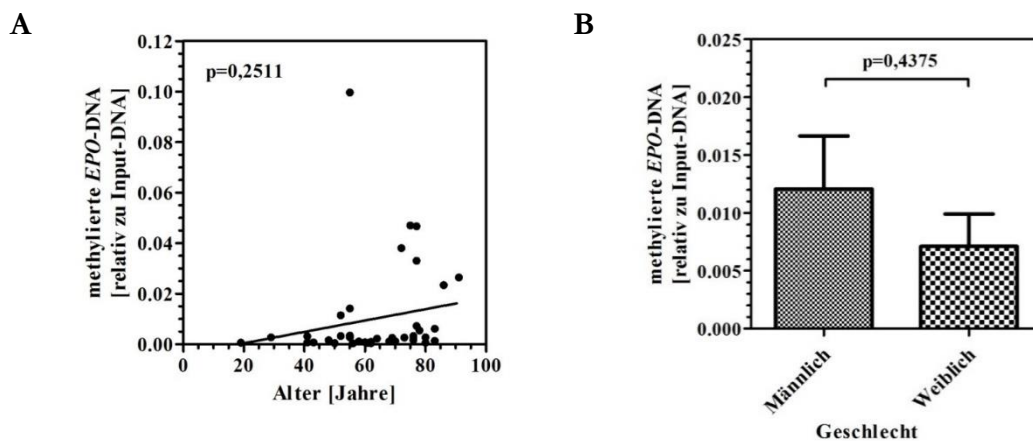


Abbildung 13: Analysen von methylierter *EPO*-DNA und allgemeinen Patientencharakteristika (Alter, Geschlecht). (A) Methylierte *EPO*-DNA in Korrelation zum Alter (n = 40). (Der Graph zeigt eine lineare Regressionsanalysen samt p-Wert.) (B) Analyse von methylierter *EPO*-DNA im männlichen (n = 25) zum weiblichen (n = 15) Geschlecht. (Der Graph zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SEM und den p-Wert.)



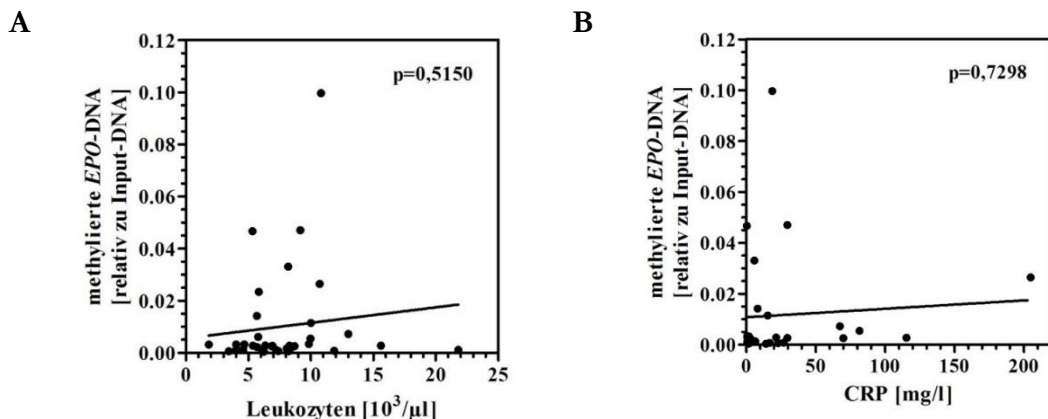


Abbildung 14: Korrelationen von methylierter *EPO-DNA* zur Leukozytenzahl und zum CRP. (A) Methylierte *EPO-DNA* in Korrelation zu Leukozyten (n = 36). (B) Methylierte *EPO-DNA* in Korrelation zum CRP (n = 28). (Die Graphen zeigen lineare Regressionsanalysen samt p-Wert.)

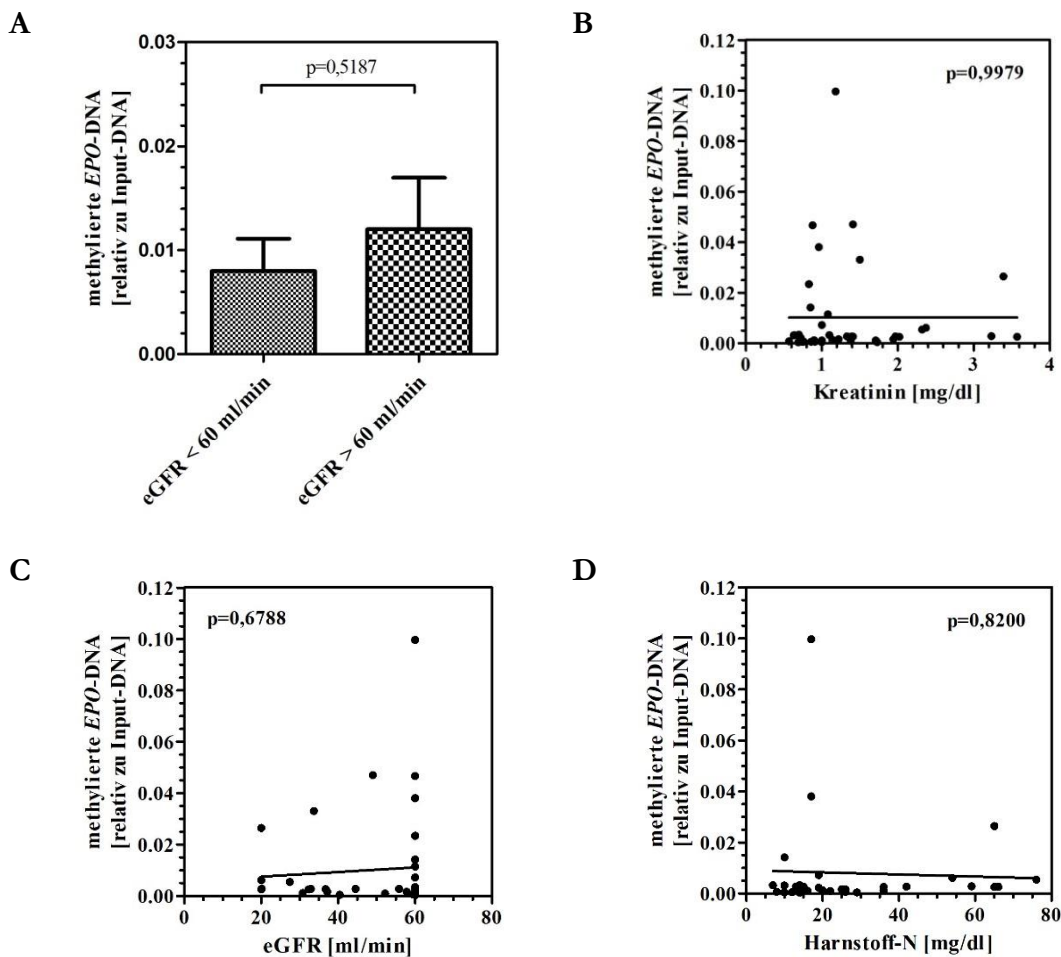


Abbildung 15: Analysen von methylierter *EPO-DNA* und der Nierenfunktion. (A) Methylierte *EPO-DNA* in Patienten mit einer eGFR < 60 ml/min (n = 18) zu einer eGFR > 60 ml/min (n = 22). (Der Graph zeigt die Mittelwerte ± SEM und den p-Wert.) (B) Methylierte *EPO-DNA* in Korrelation zum Kreatinin (n = 40). (C) Methylierte *EPO-DNA* in Korrelation zur eGFR (n = 40). (D) Methylierte *EPO-DNA* in Korrelation zum Harnstoff-N (n = 30). (Die Graphen B-D zeigen lineare Regressionsanalysen samt p-Wert.)

### 3.4 Analysen von methylierter DNA und Erkrankungen mit kardiovaskulärer Pathologie

Da in Kapitel 3.2.2 eine Assoziation von eingeschränkter Nierenfunktion und erhöhten Messwerten methylierter DNA nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, inwieweit erhöhte DNA-Methylierungswerte auch mit Erkrankungen, die eine kardiovaskuläre Pathologie aufweisen, verknüpft werden können. Unter diesem Aspekt wurden die Patienten hinsichtlich bekannter Herzinsuffizienz (HF), koronarer Herzkrankheit (KHK) und eingeschränkter Ejektionsfraktion (EF) untersucht. Zusätzliche kardiovaskuläre Risikofaktoren wie eine arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie etc. wurden nicht weitergehend berücksichtigt und führten zu keinem Abschluss.

Zum einen wurden Patienten mit klinischen Hinweisen auf eine Herzinsuffizienz ( $n = 15$ ) untersucht, hierbei wurden in dieser Gruppe sowohl Patienten mit reduzierter als auch mit erhaltener EF berücksichtigt. Als Kontrollgruppe verblieb das restliche Patientenkollektiv, bei dem weder klinische Hinweise auf eine Herzinsuffizienz noch auf eine eingeschränkte EF beschrieben waren. Untersucht wurden die Gene *RASAL1*, *PAX3*, *FEZ1*, *HIPK1*, *RELAXIN3* und *EPO* (Tabelle 19). Für das Gen *RELAXIN3* zeigte sich in der Gruppe der Erkrankten eine vermehrte Methylierung (Abbildung 16 E), für die anderen Gene war dies im Vergleich zu den Patienten ohne Zeichen einer Herzinsuffizienz nicht oder weniger deutlich festzustellen (Abbildung 16 A-D, F). Zum anderen erfolgten weitere Analysen, in denen die Patienten mit Zeichen einer Herzinsuffizienz hinsichtlich ihrer Nierenfunktion als zweiten Parameter unterschieden wurden. Hierbei zeigten sich für alle untersuchten Gene vermehrte Methylierungen jeweils in der Gruppe der Erkrankten mit Herzinsuffizienz und einer  $eGFR < 60$  ml/min (Abbildung 17 A-F; Tabelle 20), insbesondere waren die Ergebnisse diesbezüglich für die Gene *RASAL1* und *RELAXIN3* signifikant (Abbildung 17 A; Abbildung 17 E). Die Nierenfunktion wurde anhand der  $eGFR$  unterschieden und genauso wie in Kapitel 3.2.1 in eine eingeschränkte ( $eGFR < 60$  ml/min) und geringfügig bzw. nicht eingeschränkte Nierenfunktion ( $eGFR > 60$  ml/min) unterteilt.

Im Hinblick auf eine koronare Herzerkrankung (KHK) zeigte sich in Patienten mit KHK ( $n = 16$ ) keine signifikante Hypermethylierung bezüglich der Gene *RASAL1*, *PAX3*, *FEZ1*, *HIPK1*, *RELAXIN3* und *EPO* gegenüber den Patienten ohne bekannte KHK (Abbildung 18 A-F; Tabelle 21). Berücksichtigt wurden Patienten, bei denen eine KHK im Vorfeld diagnostiziert worden war. Patienten, bei denen zum Zeitpunkt der Untersuchung der Verdacht bzw. eine aktuelle Abklärung ohne bisheriges Endergebnis vorlag, wurden weder in der Gruppe der Erkrankten noch in der Kontrollgruppe berücksichtigt. Auch in Bezug auf die KHK erfolgten im Anschluss

weitere Analysen, in denen die Unterscheidung in Patienten mit KHK und einer eGFR < 60 ml/min sowie Patienten mit KHK und einer > eGFR 60 ml/min vorgenommen wurde (Tabelle 22). Für alle untersuchten Gene (*RASAL1*, *PAX3*, *FEZ1*, *HIPK1*, *RELAXIN3*, *EPO*) zeigten sich erhöhte Methylierungswerte in Patienten mit KHK und einer eGFR < 60 ml/min, wobei die Daten allerdings nicht signifikant waren (Abbildung 19 A-F).

Zuletzt wurden Patienten mit bekannter Einschränkung der EF untersucht (n = 11). Hierbei wurde zunächst das exakte Ausmaß der EF-Einschränkung nicht weiter berücksichtigt, sondern die Patienten mit einer EF ≤ 50 % als reine Screeninganalyse mit dem restlichen Patientenkollektiv verglichen. Patienten, bei denen klinisch eine Herzinsuffizienz als Diagnose beschrieben war, aber keine EF vorlag, wurden weder in der Gruppe der Erkrankten noch in der Kontrollgruppe berücksichtigt. Bezüglich der eingeschränkten Ejektionsfraktion (einge. EF) unterschieden sich die vorliegenden Patientengruppen hinsichtlich der Gene *RASAL1*, *PAX3*, *FEZ1*, *HIPK1* und *EPO* nicht bedeutsam (Abbildung 20 A-D; Abbildung 20 F; Tabelle 23). Lediglich für *RELAXIN3* zeigten sich die Methylierungswerte bei Erkrankten im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlicher erhöht (Abbildung 20 E). In weiteren Analysen stellten sich in Patienten mit einer EF ≤ 50 % und einer eGFR < 60 ml/min für alle untersuchten Gene erhöhte, aber nicht bedeutend unterschiedliche Hypermethylierungen im Vergleich zu den Patienten mit EF ≤ 50% und einer eGFR > 60 ml/min dar (Abbildung 21 A-F; Tabelle 24).

Letztlich wurde die Ejektionsfraktion (n = 11) zu dem Methylierungsgrad der DNA korreliert, ohne dass sich aber diesbezüglich signifikante Werte für die untersuchten Gene zeigten (Abbildung 22 A-F; Tabelle 25).

Tabelle 19: Analyse von methylierter DNA in Patienten mit und ohne bekannte Herzinsuffizienz (HF).

Gen	Vergleichsparameter	Probenanzahl: HF	Probenanzahl: Keine HF be- kannt	p-Wert
<i>RASAL1</i>	HF	15	28	0,6711
<i>PAX3</i>	HF	15	28	0,1395
<i>FEZ1</i>	HF	12	28	0,3579
<i>HIPK1</i>	HF	15	28	0,2770
<i>RELAXIN3</i>	HF	15	28	0,0511
<i>EPO</i>	HF	13	27	0,5400

Tabelle 20: Analyse von methylierter DNA in Patienten mit Herzinsuffizienz (HF) zur Nierenfunktion.

Gen	Vergleichsparameter	Probenanzahl:	Probenanzahl:	p-Wert
		HF + eGFR < 60 ml/min	HF + eGFR > 60 ml/min	
<i>RASAL1</i>	HF und Nierenfunktion	8	7	0,0408
<i>PAX3</i>	HF und Nierenfunktion	8	7	0,1993
<i>FEZ1</i>	HF und Nierenfunktion	6	6	0,3372
<i>HIPK1</i>	HF und Nierenfunktion	8	7	0,0529
<i>RELAXIN3</i>	HF und Nierenfunktion	8	7	0,0155
<i>EPO</i>	HF und Nierenfunktion	7	6	0,2863

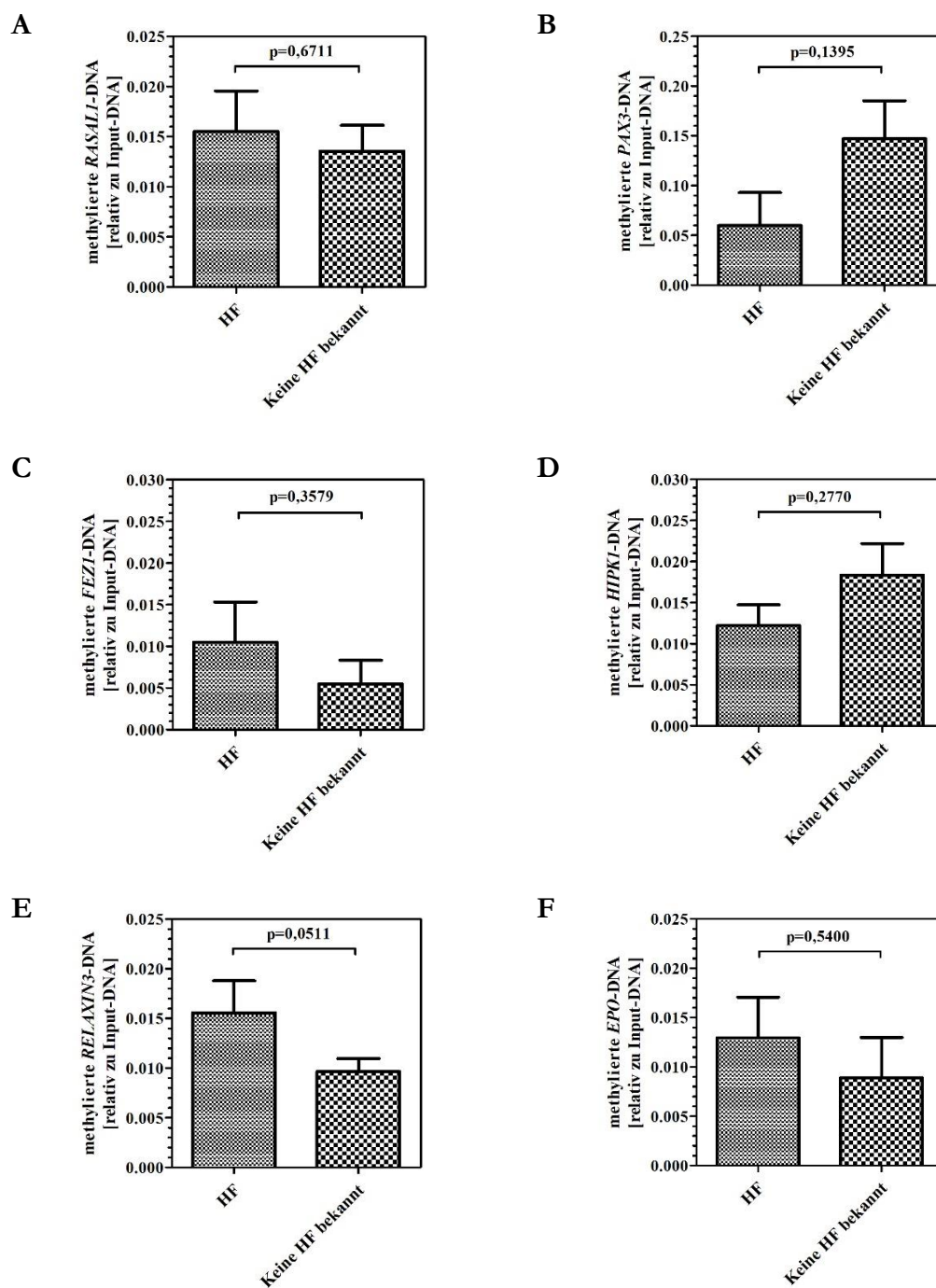


Abbildung 16: Analysen von methylierter DNA in Patienten mit und ohne bekannte Herzinsuffizienz (HF). (A) Methylierte *RASAL1*-DNA in Patienten mit ( $n = 15$ ) und ohne ( $n = 28$ ) bekannte HF. (B) Methylierte *PAX3*-DNA in Patienten mit ( $n = 15$ ) und ohne ( $n = 28$ ) bekannte HF. (C) Methylierte *FEZ1*-DNA in Patienten mit ( $n = 12$ ) und ohne ( $n = 28$ ) bekannte HF. (D) Methylierte *HIPK1*-DNA in Patienten mit ( $n = 15$ ) und ohne ( $n = 28$ ) bekannte HF. (E) Methylierte *RELAXIN3*-DNA in Patienten mit ( $n = 15$ ) und ohne ( $n = 28$ ) bekannte HF. (F) Methylierte *EPO*-DNA in Patienten mit ( $n = 13$ ) und ohne ( $n = 28$ ) bekannte HF. (Die Graphen zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM und den p-Wert.)

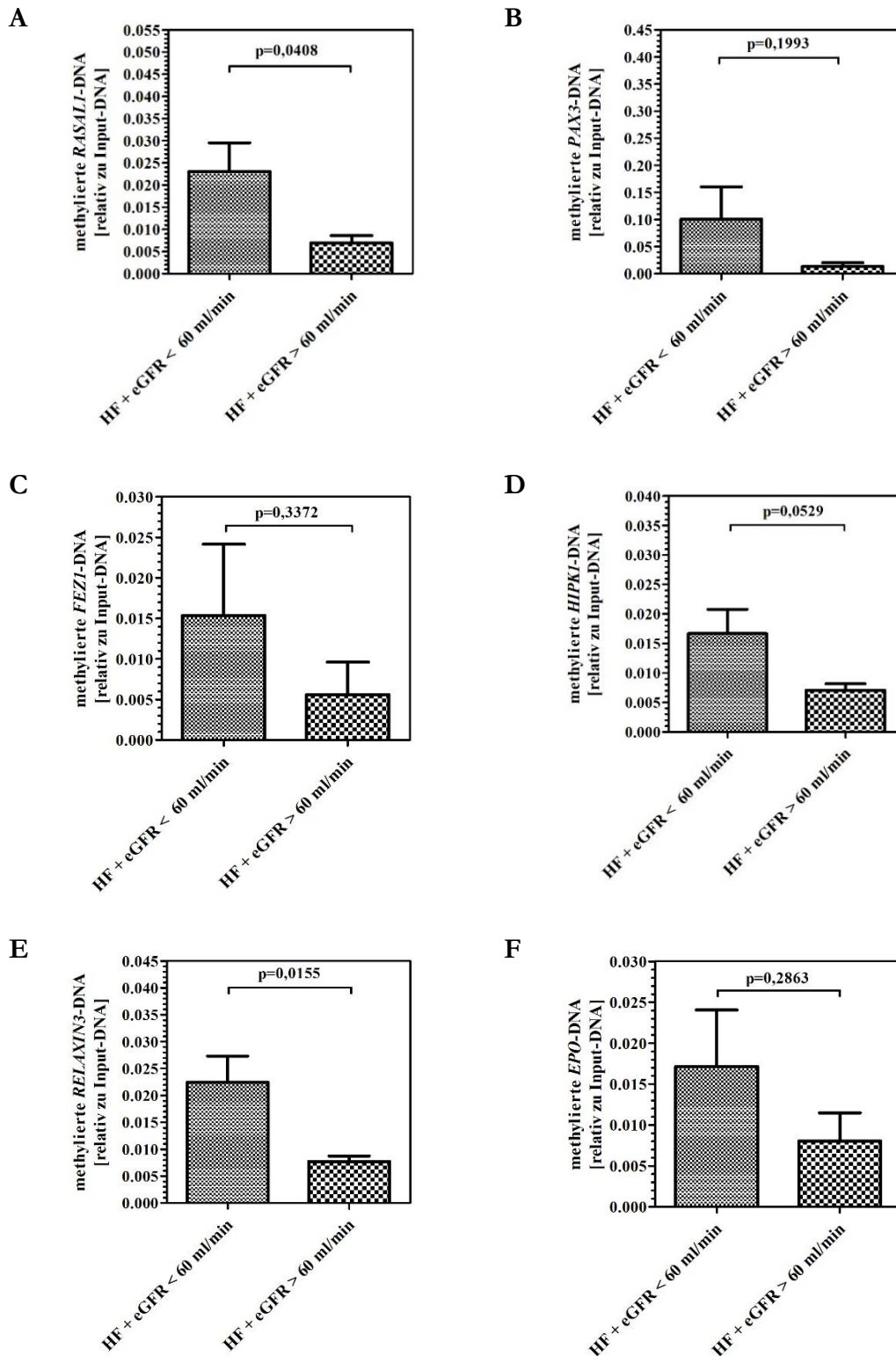


Abbildung 17: Analysen von methylierter DNA in Patienten mit Herzinsuffizienz (HF) zur Nierenfunktion. (A) Methylierte *RASAL1*-DNA in Patienten mit HF und eGFR < 60 ml/min (n = 8) zu HF und eGFR > 60 ml/min (n = 7). (B) Methylierte *PAX3*-DNA in Patienten mit HF und eGFR < 60 ml/min (n = 8) zu HF und eGFR > 60 ml/min (n = 7). (C) Methylierte *FEZ1*-DNA in Patienten mit HF und eGFR < 60 ml/min (n = 6) zu HF und eGFR > 60 ml/min (n = 6). (D) Methylierte *HIPK1*-DNA in Patienten mit HF und eGFR < 60 ml/min (n = 8) zu HF und eGFR > 60 ml/min (n = 7). (E) Methylierte *RELAXIN3*-DNA in Patienten mit HF und eGFR < 60 ml/min (n = 8) zu HF und eGFR > 60 ml/min (n = 7). (F) Methylierte *EPO*-DNA in Patienten mit HF und

eGFR < 60 ml/min (n = 7) zu HF und eGFR > 60 ml/min (n = 6). (Die Graphen zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM und den p-Wert.)

Tabelle 21: Analyse von methylierter DNA in Patienten mit und ohne bekannte KHK.

<b>Gen</b>	<b>Vergleichsparameter</b>	<b>Probenanzahl: KHK</b>	<b>Probenanzahl: Keine KHK bekannt</b>	<b>p-Wert</b>
<i>RASAL1</i>	KHK	16	24	0,6961
<i>PAX3</i>	KHK	16	24	0,0715
<i>FEZ1</i>	KHK	13	24	0,1581
<i>HIPK1</i>	KHK	16	24	0,2942
<i>RELAXIN3</i>	KHK	16	24	0,2576
<i>EPO</i>	KHK	15	23	0,5729

Tabelle 22: Analyse von methylierter DNA in Patienten mit KHK zur Nierenfunktion.

<b>Gen</b>	<b>Vergleichsparameter</b>	<b>Probenanzahl: KHK + eGFR &lt; 60 ml/min</b>	<b>Probenanzahl: KHK + eGFR &gt; 60 ml/min</b>	<b>p-Wert</b>
<i>RASAL1</i>	KHK und Nierenfunktion	9	7	0,2045
<i>PAX3</i>	KHK und Nierenfunktion	9	7	0,1990
<i>FEZ1</i>	KHK und Nierenfunktion	7	6	0,9355
<i>HIPK1</i>	KHK und Nierenfunktion	9	7	0,2158
<i>RELAXIN3</i>	KHK und Nierenfunktion	9	7	0,3150
<i>EPO</i>	KHK und Nierenfunktion	8	7	0,5987

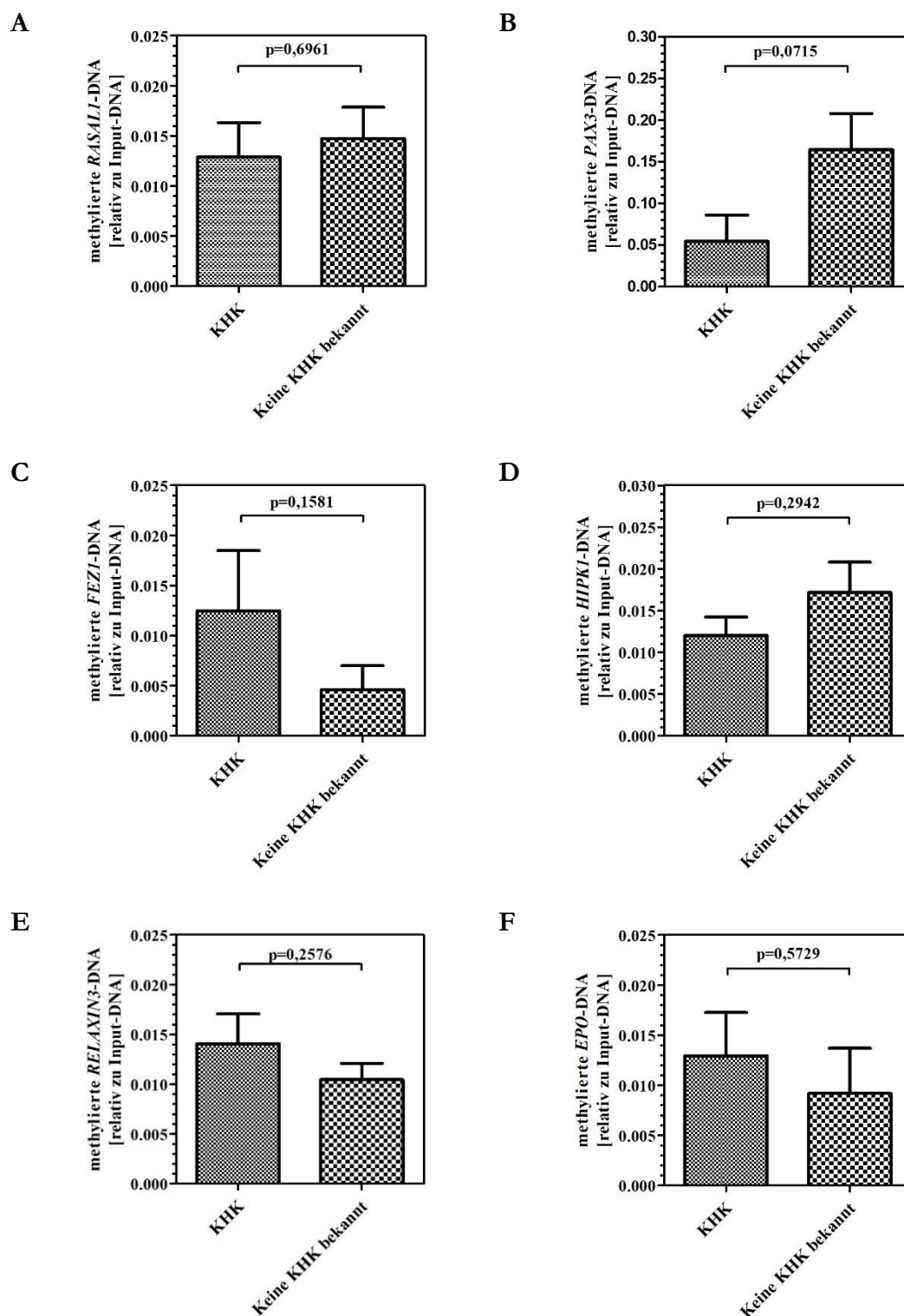


Abbildung 18: Analysen von methylierter DNA in Patienten mit und ohne bekannte KHK. (A) Methylierte *RASAL1*-DNA in Patienten mit (n = 16) und ohne (n = 24) bekannte KHK. (B) Methylierte *PAX3*-DNA in Patienten mit (n = 16) und ohne (n = 24) bekannte KHK. (C) Methylierte *FEZ1*-DNA in Patienten mit (n = 13) und ohne (n = 24) bekannte KHK. (D) Methylierte *HIPK1*-DNA in Patienten mit (n = 16) und ohne (n = 24) bekannte KHK. (E) Methylierte *RELAXIN3*-DNA in Patienten mit (n = 16) und ohne (n = 24) bekannte KHK. (F) Methylierte *EPO*-DNA in Patienten mit (n = 15) und ohne (n = 24) bekannte KHK. (Die Graphen zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM und den p-Wert.)



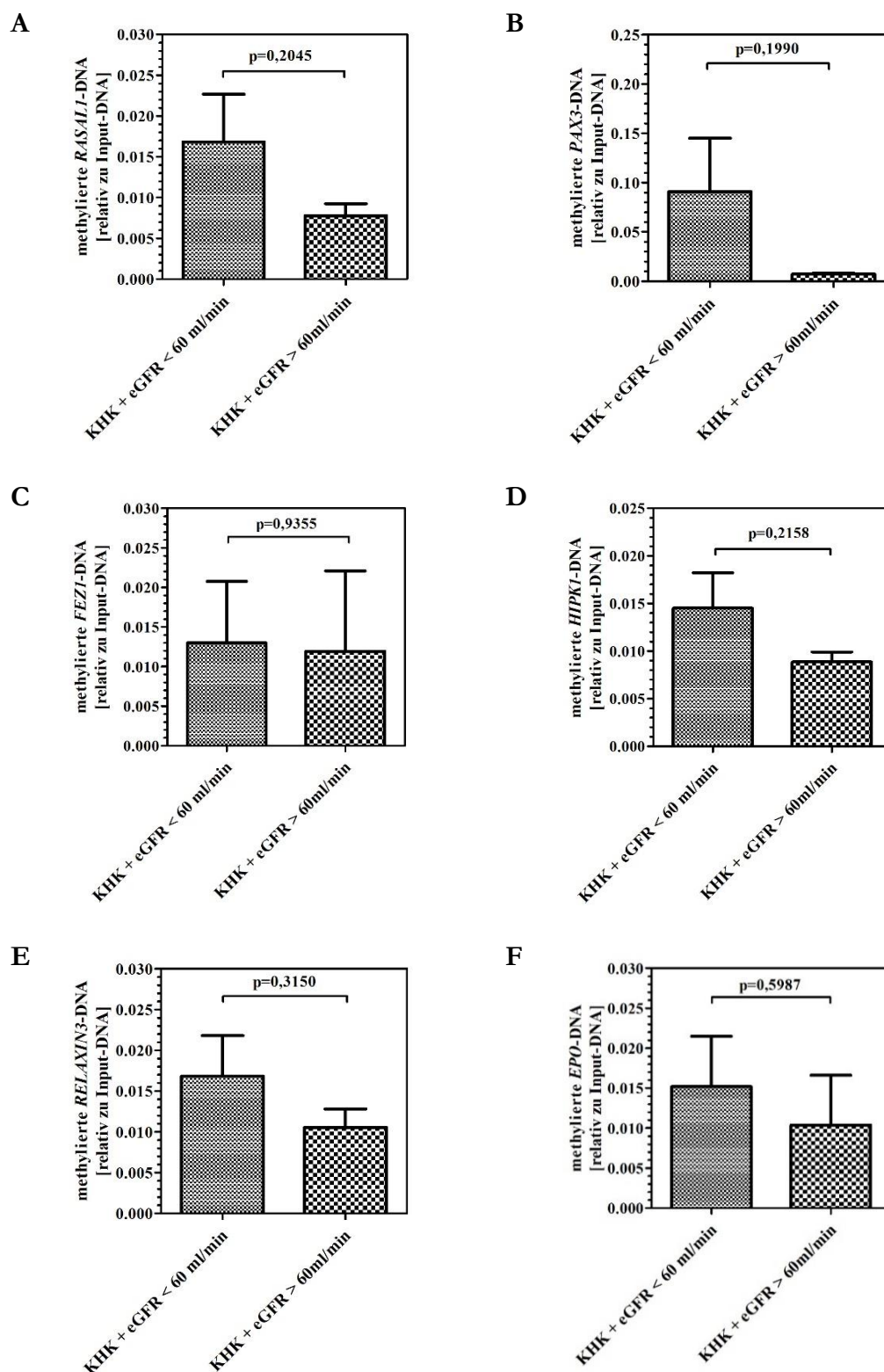


Abbildung 19: Analysen von methylierter DNA in Patienten mit KHK zur Nierenfunktion. (A) Methylierte *RASAL1*-DNA in Patienten mit KHK und eGFR < 60 ml/min (n = 9) zu KHK und eGFR > 60 ml/min (n = 7). (B) Methylierte *PAX3*-DNA in Patienten mit KHK und eGFR < 60 ml/min (n = 9) zu KHK und eGFR > 60 ml/min (n = 7). (C) Methylierte *FEZ1*-DNA in Patienten mit KHK und eGFR < 60 ml/min (n = 7) zu KHK und eGFR > 60 ml/min (n = 6). (D) Methylierte *HIPK1*-DNA in Patienten mit KHK und eGFR < 60 ml/min (n = 9) zu KHK und eGFR > 60 ml/min (n = 7). (E) Methylierte *RELAXIN3*-DNA in Patienten mit KHK und

eGFR < 60 ml/min (n = 9) zu KHK und eGFR > 60 ml/min (n = 7). (F) Methylierte *EPO-DNA* in Patienten mit KHK und eGFR < 60 ml/min (n = 8) zu KHK und eGFR > 60 ml/min (n = 7). (Die Graphen zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM und den p-Wert.)

Tabelle 23: Analyse von methylierter DNA in Patienten mit und ohne eingeschränkte Ejektionsfraktion (einge. EF).

Gen	Vergleichsparameter	Probenanzahl: Eingeschränkte EF	Probenanzahl: Keine einge. EF bekannt	p-Wert
<i>RASAL1</i>	Eingeschränkte EF	11	29	0,7732
<i>PAX3</i>	Eingeschränkte EF	11	29	0,1023
<i>FEZ1</i>	Eingeschränkte EF	8	29	0,1337
<i>HIPK1</i>	Eingeschränkte EF	11	29	0,4238
<i>RELAXIN3</i>	Eingeschränkte EF	11	29	0,0220
<i>EPO</i>	Eingeschränkte EF	10	28	0,3135

Tabelle 24: Analyse von methylierter DNA in Patienten mit eingeschränkter EF (einge. EF) zur Nierenfunktion.

Gen	Vergleichsparameter	Probenanzahl: Einge. EF + eGFR < 60 ml/min	Probenanzahl: Einge. EF + eGFR > 60 ml/min	p-Wert
<i>RASAL1</i>	Einge. EF und Nierenfunktion	7	4	0,1382
<i>PAX3</i>	Einge. EF und Nierenfunktion	7	4	0,4375
<i>FEZ1</i>	Einge. EF und Nierenfunktion	5	3	0,6377
<i>HIPK1</i>	Einge. EF und Nierenfunktion	7	4	0,2250
<i>RELAXIN3</i>	Einge. EF und Nierenfunktion	7	4	0,1481
<i>EPO</i>	Einge. EF und Nierenfunktion	6	4	0,4199

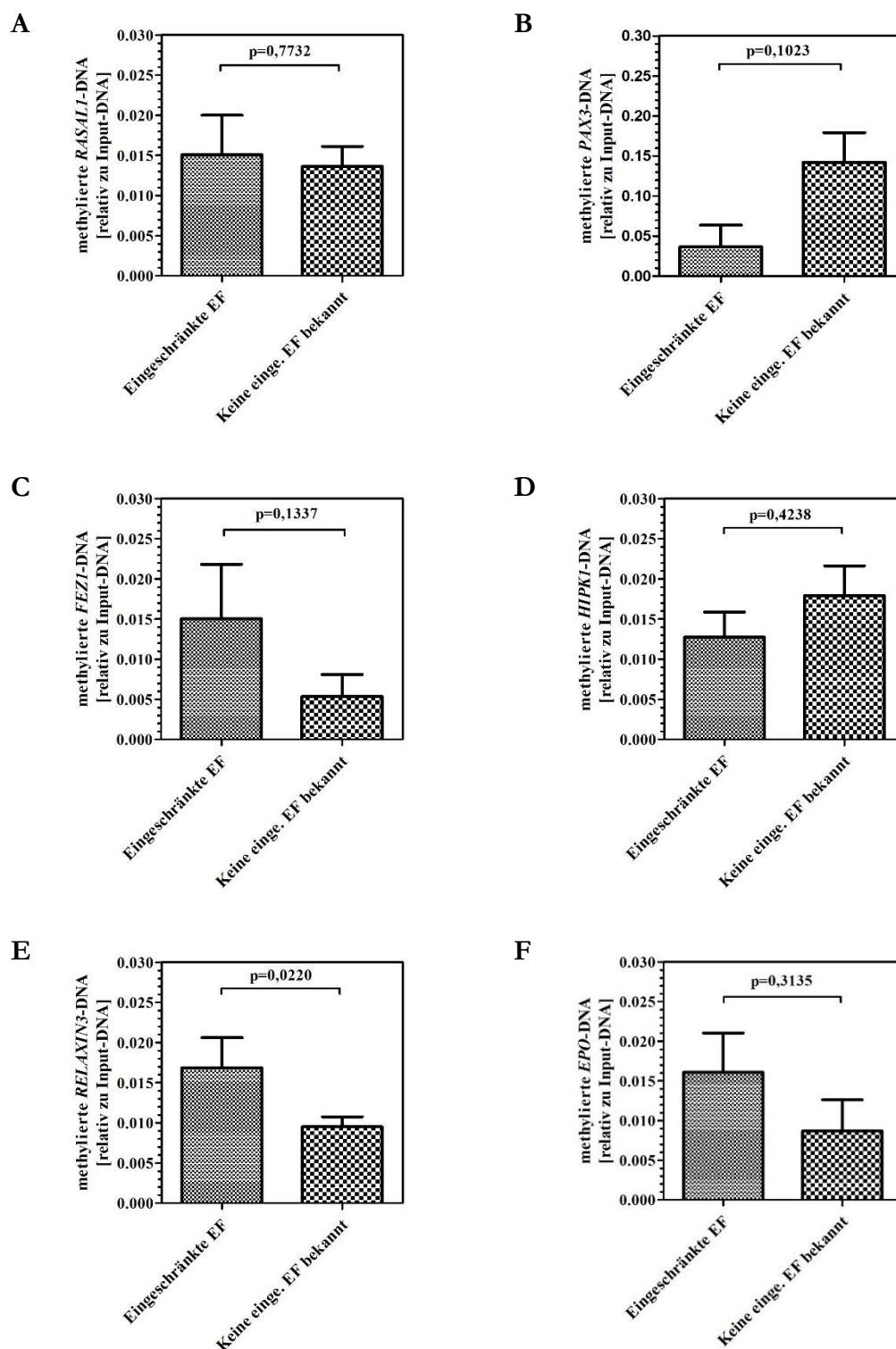


Abbildung 20: Analysen von methylierter DNA in Patienten mit und ohne eingeschränkte EF (eing. EF). (A) Methylierte *RASAL1*-DNA in Patienten mit (n = 11) und ohne (n = 29) eing. EF. (B) Methylierte *PAX3*-DNA in Patienten mit (n = 11) und ohne (n = 29) eing. EF. (C) Methylierte *FEZ1*-DNA in Patienten mit (n = 8) und ohne (n = 29) eing. EF. (D) Methylierte *HIPK1*-DNA in Patienten mit (n = 11) und ohne (n = 29) eing. EF. (E) Methylierte *RELAXIN3*-DNA in Patienten mit (n = 11) und ohne (n = 29) eing. EF. (F) Methylierte *EPO*-DNA in Patienten mit (n = 10) und ohne (n = 28) eing. EF. (Die Graphen zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM und den p-Wert.)

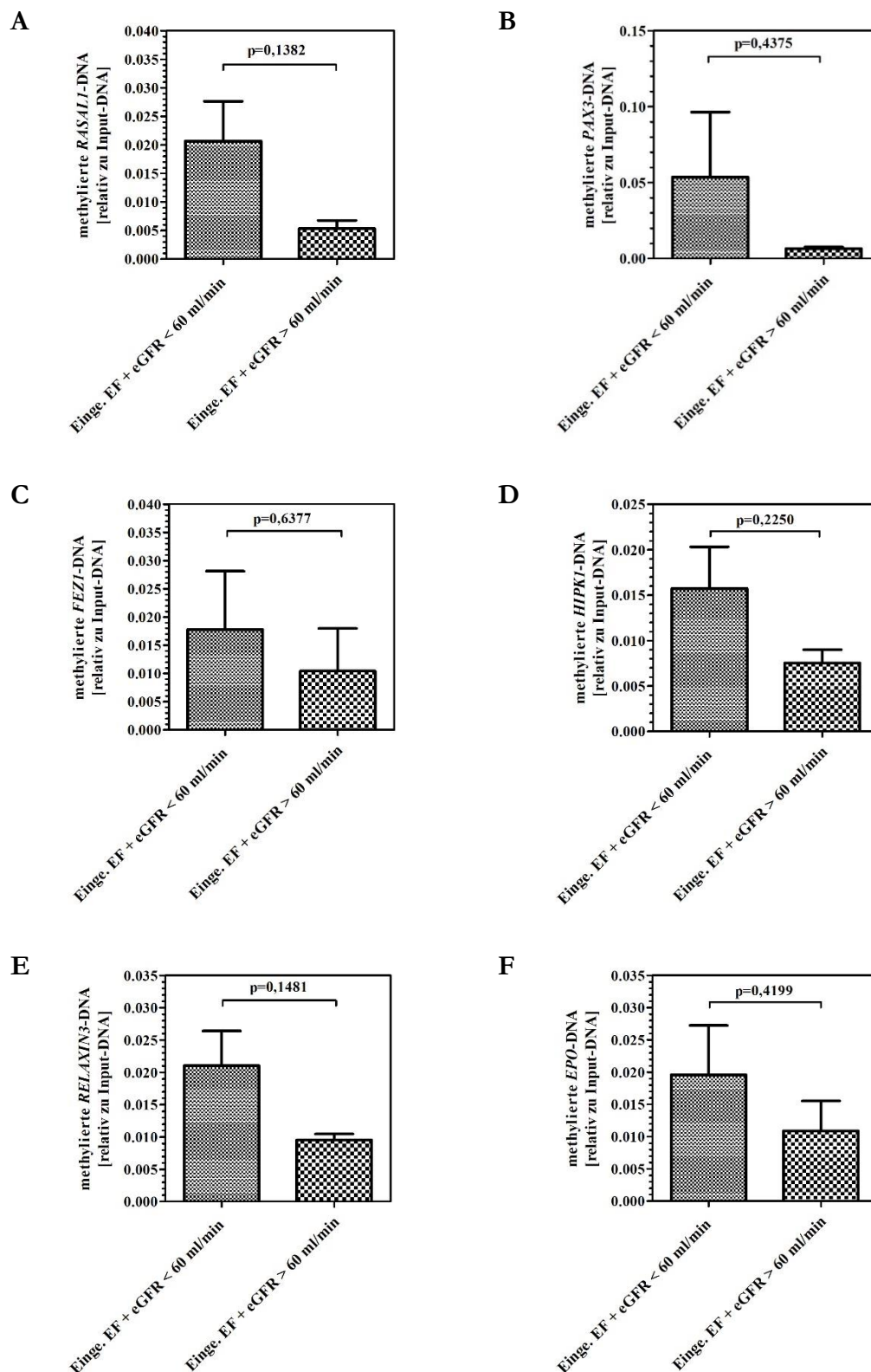


Abbildung 21: Analysen von methylierter DNA in Patienten mit eingeschränkter EF zur Nierenfunktion. (A) Methylierte *RASAL1*-DNA in Patienten mit einge. EF und eGFR < 60 ml/min (n = 7) zu einge. EF und eGFR > 60 ml/min (n = 4). (B) Methylierte *PAX3*-DNA in Patienten mit einge. EF und eGFR < 60 ml/min (n = 7) zu einge. EF und eGFR > 60 ml/min (n = 4). (C) Methylierte *FEZ1*-DNA in Patienten mit einge. EF und eGFR < 60 ml/min (n = 5) zu einge. EF und eGFR > 60 ml/min (n = 3). (D) Methylierte *HIPK1*-DNA in

Patienten mit einge. EF und eGFR < 60 ml/min (n = 7) zu einge. EF und eGFR > 60 ml/min (n = 4). (E) Methylierte *RELAXIN3-DNA* in Patienten mit einge. EF und eGFR < 60 ml/min (n = 7) zu einge. EF und eGFR > 60 ml/min (n = 4). (F) Methylierte *EPO-DNA* in Patienten mit einge. EF und eGFR < 60 ml/min (n = 6) zu einge. EF und eGFR > 60 ml/min (n = 4). (Die Graphen zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM und den p-Wert.)

Tabelle 25: Analyse von methylierter DNA in Korrelation zur Ejektionsfraktion (EF).

<b>Gen</b>	<b>Korrelationsparameter</b>	<b>Probenanzahl</b>	<b>p-Wert</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>Steigung</b>
<i>RASAL1</i>	Ejektionsfraktion	11	0,4934	0,05358	-0,0002585 $\pm$ 0,0003621
<i>PAX3</i>	Ejektionsfraktion	11	0,2877	0,1242	-0.002198 $\pm$ 0.001946
<i>FEZ1</i>	Ejektionsfraktion	8	0,2500	0,2128	0.0005381 $\pm$ 0.0004225
<i>HIPK1</i>	Ejektionsfraktion	11	0,5989	0,03197	-0.0001275 $\pm$ 0.0002338
<i>RELAXIN3</i>	Ejektionsfraktion	11	0,9810	0,00006654	-0.000006982 $\pm$ 0.0002853
<i>EPO</i>	Ejektionsfraktion	10	0,0959	0,3080	0.0005671 $\pm$ 0.0003005

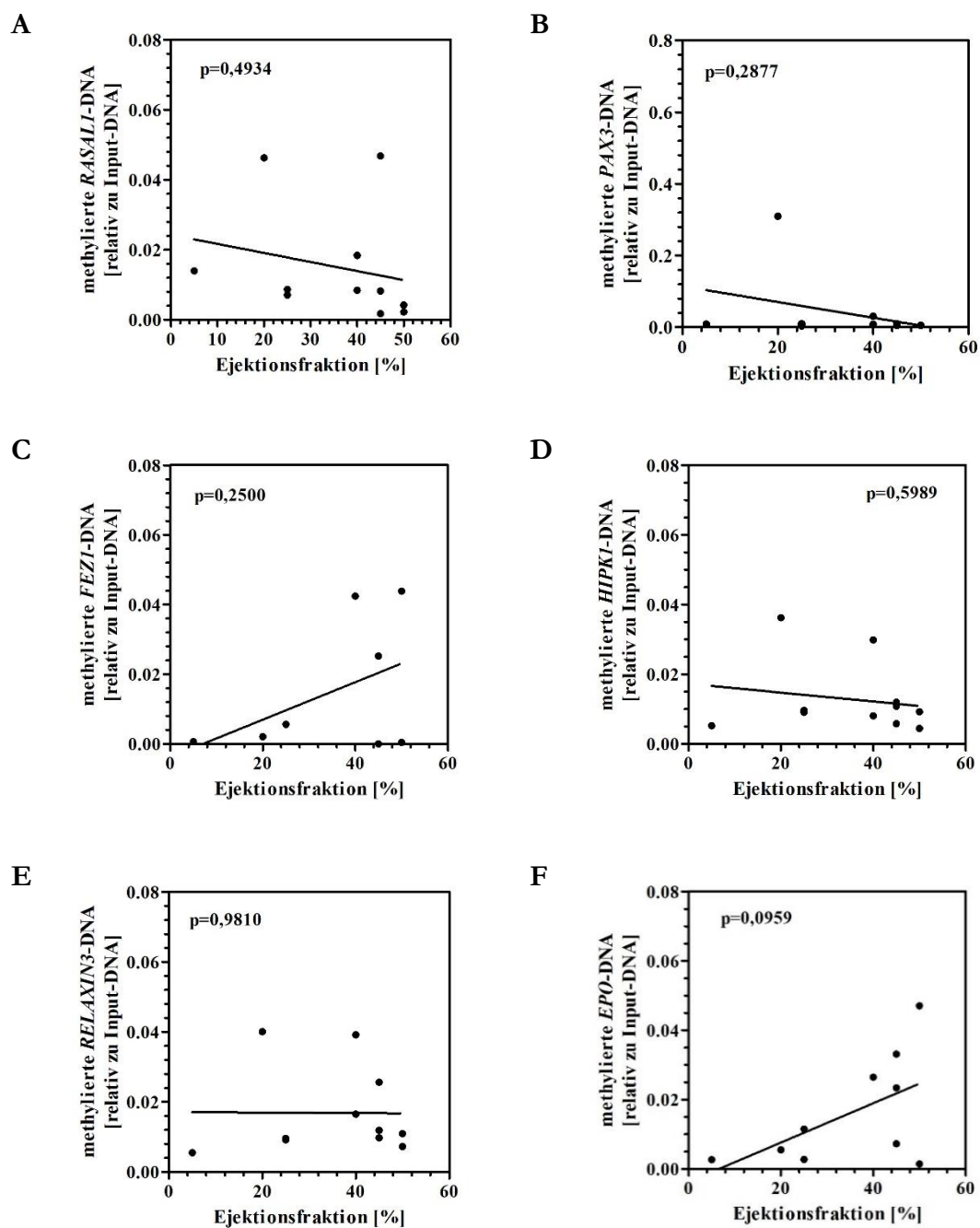


Abbildung 22: Korrelationen von methylierter DNA zur Ejektionsfraktion. (A) Methylierte *RASAL1*-DNA in Korrelation zur Ejektionsfraktion (n = 11). (B) Methylierte *PAX3*-DNA in Korrelation zur Ejektionsfraktion (n = 11). (C) Methylierte *FEZ1*-DNA in Korrelation zur Ejektionsfraktion (n = 8). (D) Methylierte *HIPK1*-DNA in Korrelation zur Ejektionsfraktion (n = 11). (E) Methylierte *RELAXIN3*-DNA in Korrelation zur Ejektionsfraktion (n = 11). (F) Methylierte *EPO*-DNA in Korrelation zur Ejektionsfraktion (n = 10). (Die Graphen zeigen lineare Regressionsanalysen samt p-Wert.)

## 4 Diskussion

### 4.1 Methylierte *RASAL1*-DNA in peripheren Blutlymphozyten nierenkranker Patienten

In einem genomweiten Methylierungsscreening an Fibroblasten aus gesunden und fibrotischen Nieren war die Identifikation von zwölf relevanten Genen (u. a. *RASAL1*, *PAX3*, *FEZ1*, *HIPK1*) gelungen, welche bei abnormal aktivierten Fibroblasten eine Hypermethylierung erkennen ließen (Bechtel et al. 2010). Hierbei fiel insbesondere eine Hypermethylierung von CpG-Inseln in der Promotorregion von *RASAL1* auf (Bechtel et al. 2010). Weitere tierexperimentelle Untersuchungen konnten in der Folge nachweisen, dass die Hypermethylierung von *RASAL1* an dem Fibroseprozess der Niere kausal beteiligt ist und methylierte DNA-Fragmente auch im peripheren Blut detektierbar sind (Bechtel et al. 2010; Tampe et al. 2014; Tampe et al. 2015). Therapeutisch wurde der Aspekt und die Relevanz der epigenetischen Methylierung darüber hinaus in der Literatur unterstützt, indem eine Normalisierung der aberranten Promotormethylierung durch die Gabe von 5'-Azacytidin oder Hydralazin zu einer verringerten Aktivierung der Fibroblasten und der Fibrogenese in experimentell-induzierter Fibrose führte (Bechtel et al. 2010; Tampe et al. 2015). In diesem Zusammenhang beinhaltete die erste Fragestellung der vorliegenden Arbeit, ob sich die in Tiermodellen mehrfach beschriebene Hypermethylierung von Promotorfragmenten auch im Blut nierenkranker Patienten reproduzierbar detektieren lässt. Dafür wurde das Vorkommen von methylierter *RASAL1*-DNA in menschlichen peripheren Blutlymphozyten (PBL) untersucht. Um die Methode und den Nachweis der Promotormethylierung zu etablieren, erfolgte zunächst eine Screeninganalyse in einer kleinen Patientenkohorte (n = 6). Vereinbar mit der genannten Literatur zeigte sich in diesem Rahmen bereits, dass nierenkranke Patienten mit einer eGFR < 60 ml/min eine signifikante Hypermethylierung von *RASAL1*-Promotorfragmenten in peripheren Blutlymphozyten (PBL) im Vergleich zu Patienten mit einer eGFR > 60 ml/min aufwiesen. Die Überlegung und damit erste Fragestellung dieser Arbeit, ob sich der Nachweis der Hypermethylierung von *RASAL1*-Promotorfragmenten aus den Tiermodellen grundlegend auch auf humane Adulte transferieren und eine aberrante Hypermethylierung somit auch im Blut nierenkranker Patienten aufzeigen lässt, bestätigte sich damit. Diese Erkenntnis stellte die Basis für die folgenden Untersuchungen dar.

## 4.2 Methylierte *RASAL1*-DNA als möglicher Biomarker für Nierenfibrose

Der Gedanke, dass aberrante DNA-Methylierung als möglicher Biomarker zur Risikostratifizierung und Prognoseabschätzung im Rahmen der Fibrose genutzt werden könnte, ist nicht gänzlich neu und wurde in der Forschung bereits thematisiert (Zeisberg und Zeisberg 2013). Wie in Kapitel 1.6 aufgeführt, ist die grundlegende Art des Nachweises von zirkulierenden DNA-Fragmenten im Blut und ihre Verwendung als diagnostische Option auch Gegenstand mehrerer Studien der Krebsforschung.

Um hypermethylierte *RASAL1*-DNA als möglichen Biomarker im Blut nierenkranker Patienten weitergehend identifizieren und bestätigen zu können, erfolgten Validierungsuntersuchungen in einem größeren Patientenkollektiv ( $n = 43$ ). Diese Untersuchungen konnten die Annahme und den Nachweis der Hypermethylierung von *RASAL1*-DNA in Patienten mit einer eGFR  $< 60$  ml/min im Vergleich zu einer eGFR  $> 60$  ml/min signifikant bekräftigen. Eine Beeinflussung oder Abhängigkeit durch allgemeine Patientencharakteristika (Alter, Geschlecht), individuell unterschiedliche Leukozytenzahlen oder Leukozytenproliferation im Rahmen einer Entzündung zeigten sich im Hinblick auf die Methylierungswerte in den peripheren Blutlymphozyten, welche eine Unterform der Leukozyten darstellen, in ergänzenden Analysen nicht.

Das Fortschreiten und die Progression einer Nierenfibrose erscheinen interindividuell verschieden, auch wenn Diagnose, Komorbiditäten und Umweltfaktoren identisch sind (Tampe und Zeisberg 2012). Tierexperimentell ist eine Korrelation von methylierten *RASAL1*-DNA-Fragmenten zum Methylierungsgrad in der Niere sowie ein Anstieg methylierter *RASAL1*-DNA bei zunehmender Nierenfibrose beschrieben (Tampe et al. 2015). Hinsichtlich der einzelnen Nierenretentionsparameter konnte in der vorliegenden Arbeit die damit verbundene Überlegung bestätigt werden, dass eine Akkumulation methylierter DNA im Blut signifikant mit steigenden Nierenretentionsparametern (Anstieg von Plasmakreatinin und Harnstoff-N, Abfall der eGFR) für das Gen *RASAL1* einhergeht. Damit ließ sich auch die zweite Fragestellung dieser Arbeit verifizieren und sich das Level methylierter *RASAL1*-DNA im Blut in humanen Adulten mit laborchemischen Nierenretentionsparametern korrelieren. Signifikante Methylierungswerte der *RASAL1*-Promotorfragmente zeigten sich dabei für alle drei genannten Nierenretentionsparameter (Plasmakreatinin, eGFR, Harnstoff-N), die höchste Signifikanz erwies sich für die eGFR. Der Parameter der glomerulären Filtrationsrate ist es auch, der als bestes Maß für die Nierenfunktion gilt und gemäß *National Kidney Foundation* basierend zur Klassifikation der chronischen Nierenerkrankung hingezogen wird (Levey et al. 2003; Mula-Abed et al. 2012).



Obwohl die Analysen in der vorliegenden Arbeit in einem sehr heterogenen Patientenkollektiv mit unterschiedlichen Diagnosen sowie Komorbiditäten erfolgten und dadurch teilweise eine Limitation erfuhren, zeigte sich zusammenfassend für hypermethylierte *RASAL1*-DNA eine signifikante Akkumulation bei eingeschränkter Nierenfunktion. Es unterstrich damit die mögliche Eignung als Biomarker für eine Nierenfibrose, insbesondere im Kontext der glomerulären Filtrationsrate.

### 4.3 Identifikation von aberranter DNA-Methylierung in weiteren Genen

Vorausgehend konnte eine signifikante Akkumulation methylierter DNA im Blut mit steigenden Nierenretentionsparametern für das Gen *RASAL1* nachgewiesen werden. Um zu klären, ob auch andere Gene eine Methylierung in gleichem Maße in diesem Kontext aufweisen, erfolgten Untersuchungen für die Gene *FEZ1*, *HIPK1*, *PAX3* und *RELAXIN3*.

Hierbei wiesen Patienten mit einer eGFR < 60 ml/min jeweils erhöhte Methylierungswerte für *PAX3*, *HIPK1* und *RELAXIN3* im Vergleich zu Patienten mit einer eGFR > 60 ml/min auf, die Unterschiede waren allerdings nicht beträchtlich. Hinweise auf eine relevante Beeinflussung durch allgemeine Patientencharakteristika oder Leukozytenzahlen legten sich nicht dar. Die Auswertungen der Korrelationsanalysen von methylierter DNA zu einzelnen Nierenretentionsparametern zeigten allerdings für die Gene *PAX3* und *RELAXIN3* eine Akkumulation methylierter DNA bei ansteigendem Plasmakreatinin und abfallender eGFR. Diese Akkumulationen von methylierter DNA waren jeweils zwar nicht in gleichem Maße wie für das Gen *RASAL1* nachweisbar, dennoch ließen sich signifikante Daten erheben. Der Nachweis von methylierter DNA im Blut war damit im Kontext der Niereneinschränkung und möglichen Fibroseentstehung nicht nur auf das Gen *RASAL1* beschränkt, sondern eröffnete im Hinblick auf die Identifikation weiterer methylierter Gene in diesem Zusammenhang auch Möglichkeiten für die Gene *PAX3* und *RELAXIN3*. Insbesondere *PAX3* korrelierte neben dem Gen *RASAL1* mit einer Akkumulation methylierter Promotorfragmente bei ansteigendem Plasmakreatinin und abfallender eGFR in den durchgeführten Analysen. Das Gen *PAX3*, funktionell u. a. beteiligt an der Nierenentwicklung, war eines von zwölf Genen, welches im Rahmen des genomweiten Methylierungsscreening in fibrotischen Nierenfibroblasten eine Promotorhypermethylierung aufwies (Bechtel et al. 2010). In der Krebsforschung zeigten Untersuchungen hinsichtlich der *PAX3*-Expression und der myogenen Form des Wilmstumors, dass *PAX3* als Transkriptionsfaktor für Zelldifferenzierung im Stroma und im Mesenchym der entwickelnden Mausniere exprimiert wurde und myogene Wilmstumore mit einer *PAX3*-Expression assoziiert erschienen (Hueber et al. 2009).

Methodisch muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass abweichend von den restlichen Genen *PAX3* in allen Analysen grundlegend höhere Methylierungswerte für jeden einzelnen Patienten aufwies. Der Fokus dieser Arbeit lag nicht auf der Aussagekraft einzelner, absoluter Methylierungswerte, sondern auf den Vergleichsergebnissen der Patientenkohorten sowie auf den Korrelationsanalysen methylierter DNA und ausgewählter Laborparameter zur Risikostratifizierung. Unter diesem Aspekt und der Voraussetzung homologer Triplets wurde *PAX3* als Gen beibehalten und in dieser Arbeit berücksichtigt. Das Methylierungsniveau von *PAX3* sollte in weiteren, zukünftigen Studien von humanen Adulten überprüft werden, um die Relevanz von veränderter *PAX3*-Expression durch vermehrte Promotormethylierung und assoziierter Fibrose ausreichend bewerten und endgültig einordnen zu können.

In dem von Bechtel et al. (2010) veröffentlichten Methylierungsscreening an Fibroblasten aus gesunden und fibrotischen Nieren wiesen auch die Gene *FEZ1* und *HIPK1* eine Promotorhypermethylierung in den fibrotischen Fibroblasten auf. Dass sich die Hypermethylierung für die Gene *FEZ1*, *HIPK1* und anschließend auch für *EPO* insbesondere im Hinblick auf die Nierenretentionsparameter in der vorliegenden Arbeit nicht signifikant dargestellt hat, kann durch verschiedene Ursachen und Einflüsse bedingt sein. Als Gründe muss diskutiert werden, ob einerseits die teilweise nur gemäßigte Einschränkung der Nierenfunktion eine deutlichere Aussage verhindert hat und möglicherweise für diese betreffenden Gene eine signifikante Erhöhung methylierter DNA erst bei einer höhergradigen Einschränkung der Nierenfunktion nachweisbar ist. Andererseits hat womöglich auch die Tatsache Einfluss genommen, dass das Patientenkollektiv sowohl aus Probanden mit akuter als auch mit chronischer Nierenschädigung bestand. In diesem Kontext ist es denkbar, dass eine signifikante Veränderung der Methylierungswerte für *FEZ1*, *HIPK1* und *EPO* erst bei länger bestehender, chronischer Einschränkung der Nierenfunktion zu messen ist. Die physiologische Wundheilung einer akuten Läsion und die chronisch fortschreitende Fibrogenese unterscheidet im Falle der Fibrose die anhaltende Aktivierung der Fibroblasten, währenddessen die physiologische Reparatur ein dynamischer Prozess mit vorübergehender Aktivität ist (Tampe und Zeisberg 2012). Darüber hinaus ist zu beachten, dass die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit ausschließlich an humanen Blutproben durchgeführt worden sind und Einflüsse durch anderweitige, zirkulierende Faktoren im menschlichen Blut nicht gänzlich ausgeschlossen werden können. Im Besonderen kann in einer heterogenen Patientenkohorte, in der einzelne Patienten Erkrankungen mehrerer Organe aufweisen, die Organspezifität der erhobenen Messwerte im Blut beeinträchtigt sein. Dies hat möglicherweise auch zu einer Limitation der Ergebnisse geführt, so dass nicht sämtliche Nachweise aus vorausgegangen Tiermodellen vollständig transferiert werden konnten.

Berücksichtigt man all diese Aspekte, erscheint die Eignung von *RASAL1* als relevantes Gen und methylierte *RASAL1*-DNA als möglicher Biomarker umso deutlicher, da es bereits unter den vorliegenden Bedingungen signifikante Akkumulationen von methylierter DNA bei eingeschränkter Nierenfunktion gezeigt hat. Zur weiteren Analyse und Bestätigung sollten sich zukünftige Studien anschließen und sowohl in größeren als auch möglichst homogeneren Patientengruppen angewendet werden.

#### 4.4 Methylierte *EPO*-DNA im Kontext der renalen Anämie

Bei Patienten mit einer Niereninsuffizienz wurden bereits häufig niedrige Erythropoetinwerte im Blut gemessen, so dass bei diesen Patienten durch den Erythropoetinmangel vermehrt eine eingeschränkte Erythropoese sowie die Manifestation einer Anämie zu beobachten waren (Erslev und Besarab 1997). Zudem ist in Studien für *EPO*-Promotorregionen beschrieben, dass die Methylierung der CpG-Inseln umgekehrt mit der Expression korreliert und die Promotormethylierung von *EPO* auf diese Weise zum Gen-*Silencing* führt (Yin und Blanchard 2000; Dewi und Fatchiyah 2013). Chang et al. (2016) stellte in Mausmodellen die Hemmung der *EPO*-Expression durch Methylierung der Promotorregionen in fibrotischem Nierenmaterial dar. Die vorliegende Arbeit befasste sich daher auch mit der Fragestellung, ob und inwieweit der epigenetische Regulationsmechanismus der DNA-Methylierung in Folgeerkrankungen einer Nierenfibrose wie der renalen Anämie nachweisbar und mit einer Akkumulation von methylierter *EPO*-DNA assoziiert ist.

Die Korrelationsanalyse von methylierter *EPO*-DNA und den Hämoglobinwerten der gesamten Patientenkohorte zeigte, zunächst anders als erwartet, keine signifikante Akkumulation methylierter *EPO*-DNA bei niedrigem Hämoglobinwert. Beeinflusst und dadurch limitiert kann dieses Ergebnis durch die Heterogenität der Patientenkohorte worden sein, da sowohl Patienten mit akuter als auch chronischer Nierenerkrankung unabhängig vom Ausmaß ihrer Nierenfunktionsstörung berücksichtigt wurden. Zum anderen ist Erythropoetin nicht als einzige Determinante der Erythropoese bekannt und andere Faktoren können Einfluss auf den humanen Hämoglobinwert genommen haben. Eisen- oder Folsäuremangel, Knochenmarksschäden, Entzündungen, Blutungen oder Urämie können beispielsweise den Gehalt an roten Blutkörperchen im Blut ebenso beeinflussen (Erslev und Besarab 1997; Shaikh und Aeddula 2022). Insbesondere tritt bei Patienten mit einer fortgeschrittenen, terminalen Nierenerkrankung häufig gleichzeitig auch das Bild einer chronischen, inflammatorischen Reaktion auf (Stenvinkel 2001). Infolgedessen ist eine klare Abgrenzung der Ursache für eine Anämie bei nierenkranken Patienten

teilweise nur schwer zu differenzieren und die Anämie kann abhängig von mehreren Faktoren vorliegen.

Betrachtete man das Patientenkollektiv in der vorliegenden Arbeit etwas differenzierter bezüglich seiner Niereneinschränkung, indem man nur Patienten mit einem Kreatininwert  $> 1,5$  mg/dl untersuchte, stellte sich eine Korrelation von methylierter *EPO*-DNA zum Hämoglobingehalt im Blut heraus. Es handelte sich um eine kleine Patientenkohorte ( $n = 9$ ), dennoch ließ sich für dieses Patientenkollektiv eine signifikante Akkumulation von methylierter *EPO*-DNA bei niedrigem Hämoglobingehalt nachweisen. Diese Differenzierung bestätigte die Überlegung, dass möglicherweise eine gemäßigte Einschränkung der Nierenfunktion nur geringe Veränderungen in Bezug auf die methylierte *EPO*-DNA bewirkt und das Auftreten einer renalen Anämie tendenziell erst bei stärkerer Einschränkung der Nierenfunktion zur Ausprägung kommt.

Die Anämie der chronischen Nierenerkrankung ist eine Form der normozytären, normochromen, hypoproliferativen Anämie und häufig mit einem erhöhten Morbiditäts- sowie Mortalitätsrisiko verbunden (Shaikh und Aeddula 2022). Prognostisch ist die Ausprägung einer renalen Anämie daher als ungünstig einzuordnen. In diesem Zuge hat sich bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion und nachweisbarem EPO-Mangel die Substitution von EPO als eine Therapieoption im klinischen Alltag etabliert. Das Behandlungsregime mit rekombinantem humanen EPO (r-HuEPO) erfordert engmaschige Kontrollen und Evaluationen, da sowohl bei einem zu niedrigen Hämoglobinwert durch einen fortbestehenden EPO-Mangel als auch bei einem zu hohen Hämoglobinwert durch eine hochdosierte EPO-Substitution kardiovaskuläre Risiken, Morbidität sowie Mortalität steigen können (Locatelli et al. 2004; Szczech et al. 2008; Shaikh und Aeddula 2022). Grundsätzlich kann eine frühe und gleichzeitig adäquate Therapie bei dem betreffenden Patientenkollektiv das Risiko von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krankenhausaufenthalten und die Höhe der Behandlungskosten senken (Macdougall et al. 1990; Maddux et al. 2007; Shaikh und Aeddula 2022). Eine signifikante Akkumulation von methylierter *EPO*-DNA in Vergleichsanalysen bzgl. Herzinsuffizienz, KHK und Ejektionsfraktion zeigte sich in der vorliegenden Arbeit nicht. Das unterstützt die Annahme, dass EPO grundlegend als ein spezifischer Marker im Rahmen von renalen Pathologien und deren Folgeerkrankungen wie beispielsweise einer renalen Anämie auftritt, für Herz-Kreislauf-Erkrankungen jedoch eher unspezifisch ist. Dies erscheint sinnvoll, da EPO zu seinem Großteil in den peritubulären Zellen der Niere gebildet wird und seine Produktion vor allem durch renale Einschränkungen verringert sein kann (Erslev und Besarab 1997; Fisher 2003).

Zusammenfassend ließen die Analysen einen Einfluss von methylierter DNA im Kontext der renalen Anämie erkennen. Allerdings wären anschließende Studien in der Zukunft in einer größeren und homogeneren Patientenkohorte mit dem Fokus auf Patienten mit chronischer Nierenerkrankung sowie stärkerer Nierenfunktionseinschränkung zur Validierung und weiteren Analyse sinnvoll und von Nutzen.

#### **4.5 Methylierte DNA im Hinblick auf Erkrankungen mit kardiovaskulärer Pathologie**

In den Kapiteln 3.1 und 3.2 konnte für die Niere gezeigt werden, dass sich eine Akkumulation von methylierter *RASAL1*-DNA in nierenkranken Patienten nachweisen ließ und methylierte *RASAL1*-DNA im Blut damit ein möglicher Biomarker für eine Nierenfibrose darstellt. Bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion sind kardiovaskuläre Erkrankungen eine der führenden Todesursachen (Foley und Parfrey 1998). Auch im Kontext der kardialen Fibrose ist eine Beteiligung von hypermethylierter *RASAL1*-DNA beschrieben worden (Grimaldi et al. 2017). Es schloss sich daher abschließend in dieser Arbeit die ergänzende Fragestellung an, ob der Nachweis von aberranter DNA-Methylierung für das Gen *RASAL1* auch eine Assoziation bzgl. Erkrankungen mit kardiovaskulären Pathologien im vorliegenden Patientenkollektiv erkennen lässt. Hierfür wurde das heterogene Patientenkollektiv im Rahmen von Screeninganalysen bzgl. Herzinsuffizienz, KHK und eingeschränkter EF untersucht. Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie eine arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie etc. wurden an dieser Stelle nicht weitergehend berücksichtigt.

Methylierte *RASAL1*-DNA zeigte in Patienten mit Hinweisen auf eine Herzinsuffizienz sowie in Patienten mit eingeschränkter EF die Tendenz, in den peripheren Blutlymphozyten erhöht vorzuliegen. Signifikante Werte lagen allerdings nicht vor, als Limitation erwiesen sich zum einen die vermutlich zu kleine Patientenzahl sowie die Heterogenität der untersuchten Patienten mit weiteren Komorbiditäten und Risikofaktoren. Der Aspekt einer Akkumulation hypermethylierter *RASAL1*-DNA in Patienten mit kardiovaskulären Pathologien erscheint dennoch grundsätzlich naheliegend, da aberrante *RASAL1*-Methylierung zur Aktivierung von Fibroblasten beiträgt und sich in der Literatur nicht nur in der Nierenfibrose, sondern auch in der Fibrose von Leber und Herz nachweisen ließ (Bechtel et al. 2010; Tao et al. 2011; Zeisberg und Zeisberg 2013; Xu et al. 2015). In diesem Zusammenhang haben vorausgegangene Untersuchungen an menschlichen koronaren Endothelzellen gezeigt, dass eine Hypermethylierung in der Promotorregion von *RASAL1* einen transkriptionellen Verlust von *RASAL1* bewirkt und an der endothelial-mesenchymalen Transition (EndMT) sowie an dem Fortschreiten der Herzfibrose

mitbeteiligt ist (Xu et al. 2015). Außerdem ließ sich ein Einfluss von epigenetischen Mechanismen in Form von DNA-Methylierung in Studien an Herzgewebe und Patientenblut bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie bestätigen (Meder et al. 2017). Ein Zusammenhang von methylierter DNA und kardiovaskulärer Erkrankung hatte auch Haas et al. (2013) zuvor beschrieben und ebenfalls unterschiedliche DNA-Methylierungsmuster im Herzgewebe von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie nachgewiesen. Die Ergebnisse der Screeninganalysen in der vorliegenden, heterogenen Patientenkohorte zeigten zwar eine Tendenz auf, reichen aber an dieser Stelle nicht aus, um eine eindeutige und ausreichende Aussage bzgl. einer Assoziation von *RASAL1*-DNA und den Erkrankungen mit kardiovaskulärer Pathologie treffen zu können. Weitere Studien in einer größeren und differenzierteren Patientenkohorte mit umfassenden Subkohorten, beispielsweise gemäß *New York Heart Association* (NYHA)-Stadien oder gemäß Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventrikulärer EF (HF<sub>r</sub>EF), Herzinsuffizienz mit geringgradig eingeschränkter linksventrikulärer EF (HF<sub>mr</sub>EF) oder Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer EF (HF<sub>p</sub>EF), sind dafür erforderlich. Es würde zur Klärung und weiteren Einordnung beitragen, ob und inwieweit sich die vorliegende Tendenz von hypermethylierten *RASAL1*-Promotorfragmenten in Patienten mit kardiovaskulären Pathologien zur Risikostratifizierung signifikant bestätigen lässt oder ob methylierte *RASAL1*-DNA im Blut diesbezüglich zu unspezifisch ist.

Ergänzend erfolgten die kardiovaskulären Screeninganalysen auch für die restlichen Gene *PAX3*, *FEZ1*, *HIPK1*, *RELAXIN3* und *EPO*. Im Kontext der kardiovaskulären Erkrankungen wies hierbei lediglich *RELAXIN3* eine signifikante Hypermethylierung in Patienten mit Zeichen einer Herzinsuffizienz sowie mit eingeschränkter EF auf. Wie eingangs beschrieben, kann Relaxin antifibrotisch durch eine Inhibierung der TGF- $\beta$ -Kaskade sowie durch eine Induktion von MMP wirken und bietet dadurch einen kardialen Schutz (Unemori und Amento 1990; Chow et al. 2012; Collino et al. 2013; Díez und Ruilope 2016). Beim Menschen sind drei Isoformen von Relaxin bekannt: Relaxin-H1, -H2, -H3. Die Relaxinisoformen binden an verschiedene Relaxin-Rezeptoren. Im kardialen Kontext ist vor allem Serelaxin (bestehend aus rekombinantem *RELAXIN2*) Gegenstand von Forschung und Therapieoptionen. Relaxin-H3 ist ein Neuropeptid, das hauptsächlich an Stress- und Stoffwechselkontrolle beteiligt ist (Bathgate et al. 2013). Eine lokale Relaxinproduktion sowie ein Nachweis von *RELAXIN3* ist auch für die Niere beschrieben (Samuel et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine Akkumulation von methylierter *RELAXIN3*-DNA bei zunehmender Nierenfunktionseinschränkung (Anstieg von Plasmakreatinin und Abfall von eGFR), was für eine Reduktion des antifibrotischen Effekts durch eine verringerte Relaxin-Expression im Rahmen aberranter Methylierung der Promotorfragmente im Zuge einer fortschreitenden Nierenfibrose sprechen könnte. Eine

eindeutige epigenetische Beeinflussung der parenchymatösen Umbaumechanismen und der Entstehung einer kardialen Fibrose im Rahmen kardiovaskulärer Grunderkrankungen kann im Zusammenhang zu *RELAXIN3* in dieser Arbeit letztlich nicht geklärt werden, so dass zukünftige Studien von Nöten sind und neben einer Vergrößerung sowie Anpassung der Patientenkohorte, wie im vorherigen Absatz beschrieben, auch eine Erweiterung der zu untersuchenden Relaxinisoformen bedacht werden sollte.

In den abschließenden Analysen, in denen die Patienten mit Herzinsuffizienz, KHK und eingeschränkter EF jeweils hinsichtlich ihrer Nierenfunktion aufgeteilt wurden, spiegelte sich durch eine deutlich erhöhte *RASAL1*-Methylierung in Patienten mit einer eGFR < 60 ml/min erneut die Relevanz von methylierter *RASAL1*-DNA im renalen Kontext wider. Insgesamt zeigten alle untersuchten Gene (*RASAL1*, *PAX3*, *FEZ1*, *HIPK1*, *RELAXIN3*, *EPO*) jeweils erhöhte Methylierungswerte bei kombiniertem Vorliegen einer kardiovaskulären und nephrologischen Pathologie. Dies kann zum einen den Einfluss von veränderter DNA-Methylierung nochmals verdeutlichen. Zum anderen bleiben gleichzeitig an dieser Stelle die Beeinträchtigung der Organspezifität der erhobenen Messwerte im Blut sowie der mögliche Einfluss anderer Komorbiditäten oder Risikofaktoren als Limitationen bestehen. Eine ausreichend große Kontrollgruppe, die weder eine kardiovaskuläre noch eine nephrologische Pathologie aufwies, erbrachte das untersuchte Patientenkollektiv nicht. Daher müsste dies in anschließenden Studien berücksichtigt und weitergehend untersucht werden, um die endgültige Relevanz der DNA-Hypermethylierung bei Nierenfibrose sowie bei Erkrankungen mit kardiovaskulären Pathologien und einer Nierenfunktionseinschränkung als weiteren Faktor genauer einordnen und beurteilen zu können.

## 5 Zusammenfassung

Das Fortschreiten einer chronischen Nierenerkrankung gestaltet sich individuell verschieden und stellt zunehmend eine medizinische Herausforderung dar. Basierend auf der Pathophysiologie der Fibrogenese ist das Fortschreiten der Erkrankung oftmals durch eine übermäßige Fibroblastenaktivierung und parenchymatöse Umbaumechanismen gekennzeichnet, welche zur Entstehung einer Fibrose führen und letztlich in einer Funktionseinschränkung der Niere münden. In Tiermodellen ist für den Ras-Inhibitor *RASAL1* bereits dokumentiert, dass eine aberrante Methylierung von Promotorfragmenten seines Gens einen transkriptionellen Verlust von *RASAL1* bewirkt und damit kausal zur Entstehung einer Fibrose beiträgt. Die vorliegende Arbeit befasste sich in diesem Zuge mit der Frage, ob die Hypermethylierung der *RASAL1*-Promotorfragmente auch im Blut nierenkranker Patienten reproduzierbar nachweisbar ist und eine Korrelation zwischen dem Level methylierter *RASAL1*-DNA und laborchemischen Parametern mit dem Ziel der Identifikation eines möglichen Biomarkers erkennen lässt. Als Material wurde aus Vollblut extrahierte genomische DNA experimentell untersucht. Mithilfe der MeDIP-Methode erfolgte die Anreicherung methylierter Promotorfragmente durch Bindung eines Antikörpers an 5-Methylcytosin, ehe sich die Amplifikation und Messung der Methylierungswerte mittels quantitativer Real-Time PCR anschlossen. Die Analysen zeigten, dass sich im Blut nierenkranker Patienten eine signifikante Hypermethylierung von *RASAL1*-Promotorfragmenten nachweisen ließ. Ferner bestätigte sich, dass eine zunehmende Nierenfunktionseinschränkung (Anstieg von Plasmakreatinin und von Harnstoff-N, Abfall der eGFR) signifikant mit einer Akkumulation von methylierter *RASAL1*-DNA assoziiert war. Hierbei erwies sich insbesondere die eGFR als sehr aussagekräftiger Parameter. Als weitere Fragestellung, inwieweit sich die Hypermethylierung der Promotorfragmente auf das Gen *RASAL1* beschränkt oder sich auch auf andere Gene im Rahmen einer Nierenfibrose erweitern lässt, zeigten ergänzende Korrelationsanalysen aberrante DNA-Methylierungen ebenso für die Gene *PAX3* und *RELAXIN3*. Die Hypermethylierungen dieser Promotorfragmente lagen zwar nicht im gleichen Maße wie für *RASAL1* vor, wiesen aber ebenfalls jeweils signifikante Akkumulationen methylierter DNA bei zunehmender Nierenfunktionseinschränkung auf. Schließlich verblieb zu überprüfen, ob der Regulationsmechanismus aberranter DNA-Methylierung auch im Kontext von Folgeerkrankungen wie einer renalen Anämie oder im Rahmen von Erkrankungen mit kardiovaskulären Pathologien Aussagekraft hat. In diesem Zusammenhang unterstützten die Ergebnisse für die renale Anämie die Annahme, dass möglicherweise eine gemäßigte Einschränkung der Nierenfunktion nur geringe Veränderungen in Bezug auf methylierte Promotorfragmente von *Erythropoetin* bewirkt und das Auftreten einer renalen Anämie erst bei stärkerer Einschrän-



kung der Nierenfunktion zur Ausprägung kommt. Im Hinblick auf Erkrankungen mit kardiovaskulären Pathologien ließen sich erhöhte Methylierungswerte überwiegend in Patienten nachweisen, welche zusätzlich auch von einer Einschränkung der Nierenfunktion betroffen waren und somit eine Kombination aus kardiovaskulärer und nephrologischer Pathologie aufwiesen. Teilweise waren die Ergebnisse dieser Arbeit durch die begrenzte Patientenzahl sowie durch die Heterogenität der Patientenkohorten limitiert, so dass zukünftige Studien an einem größeren und homogeneren Patientenkollektiv zur weiteren Analyse und Bestätigung sinnvoll erscheinen. Dass *RASAL1* bereits unter den vorliegenden Bedingungen insbesondere im Kontext einer eingeschränkten Nierenfunktion eine signifikante Akkumulation von methylierten DNA-Fragmenten erkennen ließ, unterstreicht seine Bedeutung und seine Relevanz als möglicher Biomarker.

## 6 Anhang

Tabelle A.1: Übersicht Patientenkollektiv.

Patienten-Nr.	Alter [Jahre]	Geschlecht [m=männlich, w=weiblich]	Plasmakreatinin [mg/dl]	eGFR [ml/min/1.73 m <sup>2</sup> ]	Harnstoff-N [mg/dl]	Hämoglobin [g/dl]	Leukozyten [10 <sup>3</sup> /μl]	CRP [mg/l]	Herzinsuffizienz [1=ja, 2=nein]	KHK [1=ja, 2=nein, 3=Verdacht/Abklärung]	LVEF [%]
1	48	m	1.94	37.1	25	14.1	8.050	1.2	2	2	
2	83	w	2.37	20.0	54	10.3	5.780		2	2	
3	29	w	1.40	44.5	13	10.5	15.600		2	2	
4	76	m	2.02	32.3	36	9.0	8.690	69.9	1	2	
5	78	m	2.32	27.4	76	10.2	9.960	81.6	1	1	20
6	69	m	3.57	20.0	65	11.3	6.850	0.8	2	2	
7	64	m	0.72	> 60	19	15.2	5.690	3.2	2	3	
8	41	m	0.63	> 60	10	9.7	1.820	0.7	2	2	
9	55	m	3.23	20.1	59	10.9	6.350	21.5	2	1	
10	78	m	2.91	21.1	90	11.2	11.200	4.2	2	2	
11	81	m	0.93	> 60		12.9	8.780	1.7	1	3	
12	72	m	0.96	> 60	17				2	2	
13	62	m	1.38	52.2	22	14.0	6.130	1.2	2	1	
14	80	m	1.97	32.9	42	12.6	5.350		2	1	
15	70	m	0.90	> 60	20	12.8	4.570		1	1	
16	68	m	1.00	> 60	16	14.9	7.200		2	1	
17	58	w	1.71	30.8	36	11.3	21.800	0.7	2	2	
18	19	w	0.86	> 60		8.3	3.440		2	2	
19	61	w	0.75	> 60	12				2	2	
20	41	w	0.70	> 60	8	12.4	6.130		2	2	
21	43	w	0.76	> 60		11.4	7.390	16.8	2	2	
22	56	m	0.69	> 60	14			14.2	2	2	

Patienten-Nr.	Alter [Jahre]	Geschlecht [m=männlich, w=weiblich]	Plasmakreatinin [mg/dl]	eGFR [ml/min/1.73 m <sup>2</sup> ]	Harnstoff-N [mg/dl]	Hämoglobin [g/dl]	Leukozyten [10 <sup>3</sup> /μl]	CRP [mg/l]	Herzinsuffizienz [1=ja, 2=nein]	KHK [1=ja, 2=nein, 3=Verdacht/Abklärung]	LVEF [%]
23	60	w	0.57	> 60		12.7	11.860	27.0	2	2	
24	50	m	1.00	> 60	10	12.9	6.240	2.0	2	3	
25	55	m	0.85	> 60	10	15.4	5.680	8.2	2	2	
26	76	w	0.64	> 60	7	13.2	4.670	1.9	2	2	
27	62	m	1.73	40.4	29				2	2	
28	55	m	1.33	55.8	15	12	8.290	115.5	1	1	25
29	55	w	0.70	> 60		12.9	9.840	0.7	1	1	
30	52	m	1.08	> 60		16.5	10.000	15.4	1	1	25
31	80	w	0.91	59.5	26	12.6	8.190	22.9	2	2	
32	76	m	1.22	57.8	26	15.1	8.360		2	2	
33	52	m	1.10	> 60	14	16.0	4.020	1.9	2	2	
34	73	w	1.41	36.7	66	11.5	6.930	29.5	1	2	5
35	83	m	1.14	> 60		13.3	4.040	6.5	1	1	50
36	77	m	1.00	> 60	19	13.1	13.000	67.4	1	1	45
37	75	m	1.41	49.0		14.4	9.150	29.5	1	1	50
38	55	m	1.18	> 60	17	16.8	10.800	18.7	2	2	
39	86	w	0.83	> 60		15.0	5.830		1	2	45
40	77	w	1.50	33.7		10.6	8.170	5.8	1	1	45
41	91	w	3.39	20.0	65	7.5	10.700	204.8	1	1	40
42	77	m	0.88	> 60		11.9	5.320	0.4	2	1	
43	78	m	1.51	44.9		13.8	6.730	1.7	1	1	40

## 7 Literaturverzeichnis

- Bathgate RAD, Halls ML, van der Westhuizen ET, Callander GE, Kocan M, Summers RJ (2013): Relaxin family peptides and their receptors. *Physiol Rev* 93, 405–480
- Bechtel W, McGoohan S, Zeisberg EM, Müller GA, Kalbacher H, Salant DJ, Müller CA, Kalluri R, Zeisberg M (2010): Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat Med* 16, 544–550
- Bernstein BE, Meissner A, Lander ES (2007): The mammalian epigenome. *Cell* 128, 669–681
- Bird AP, Wolffe AP (1999): Methylation-Induced Repression—Belts, Braces, and Chromatin. *Cell* 99, 451–454
- Boyer LA, Mathur D, Jaenisch R (2006): Molecular control of pluripotency. *Curr Opin Genet Dev* 16, 455–462
- Chang YT, Yang CC, Pan SY, Chou YH, Chang FC, Lai CF, Tsai MH, Hsu HL, Lin CH, Chiang WC et al. (2016): DNA methyltransferase inhibition restores erythropoietin production in fibrotic murine kidneys. *J Clin Invest* 126, 721–731
- Choi JY, James SR, Link PA, McCann SE, Hong C-C, Davis W, Nesline MK, Ambrosone CB, Karpf AR (2009): Association between global DNA hypomethylation in leukocytes and risk of breast cancer. *Carcinogenesis* 30, 1889–1897
- Chow BSM, Chew EGY, Zhao C, Bathgate RAD, Hewitson TD, Samuel CS (2012): Relaxin signals through a RXFP1-pERK-nNOS-NO-cGMP-dependent pathway to up-regulate matrix metalloproteinases: the additional involvement of iNOS. *PLoS One* 7, e42714
- Collino M, Rogazzo M, Pini A, Benetti E, Rosa AC, Chiazza F, Fantozzi R, Bani D, Masini E (2013): Acute treatment with relaxin protects the kidney against ischaemia/reperfusion injury. *J Cell Mol Med* 17, 1494–1505
- Dewi FRP, Fatchiyah F (2013): Methylation impact analysis of erythropoietin (EPO) Gene to hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) activity. *Bioinformation* 9, 782–787
- Diaz LA, Bardelli A (2014): Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* 32, 579–586
- Díez J, Ruilope LM (2016): Serelaxin for the treatment of acute heart failure: a review with a focus on end-organ protection. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother* 2, 119–130
- Downward J (2003): Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 11–22
- Eddy AA (1996): Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 7, 2495–2508
- Erslev AJ, Besarab A (1997): Erythropoietin in the pathogenesis and treatment of the anemia of chronic renal failure. *Kidney Int* 51, 622–630
- Esposito A, Bardelli A, Criscitiello C, Colombo N, Gelao L, Fumagalli L, Minchella I, Locatelli M, Goldhirsch A, Curigliano G (2014): Monitoring tumor-derived cell-free DNA in patients with solid tumors: clinical perspectives and research opportunities. *Cancer Treat Rev* 40, 648–655
- Estécio MRH, Issa JPJ (2011): Dissecting DNA hypermethylation in cancer. *FEBS Lett* 585, 2078–2086

- Fevold HL, Hisaw FL, Meyer RK (1930): The relaxative hormone of the corpus luteum. Its purification and concentration. *J Am Chem Soc* 52, 3340–3348
- Fisher JW (2003): Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med (Maywood)* 228, 1–14
- Foley RN, Parfrey PS (1998): Cardiovascular disease and mortality in ESRD. *J Nephrol* 11, 239–245
- Francis G, Stein S (2015): Circulating Cell-Free Tumour DNA in the Management of Cancer. *Int J Mol Sci* 16, 14122–14142
- Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P (2007): Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutat Res* 635, 105–117
- Grimaldi V, Pascale MR de, Zullo A, Soricelli A, Infante T, Mancini FP, Napoli C (2017): Evidence of epigenetic tags in cardiac fibrosis. *J Cardiol* 69, 401–408
- Haas J, Frese KS, Park YJ, Keller A, Vogel B, Lindroth AM, Weichenhan D, Franke J, Fischer S, Bauer A et al. (2013): Alterations in cardiac DNA methylation in human dilated cardiomyopathy. *EMBO Mol Med* 5, 413–429
- Herman JG, Baylin SB (2003): Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349, 2042–2054
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 10, 413–417
- Hisaw FL (1926): Experimental relaxation of the pubic ligament of the guinea pig. *Exp Biol Med (Maywood)* 23, 661–663
- Hueber PA, Fukuzawa R, Elkares R, Chu L, Blumentkrantz M, He SJ, Anaka MR, Reeve AE, Eccles M, Jabado N et al. (2009): PAX3 is expressed in the stromal compartment of the developing kidney and in Wilms tumors with myogenic phenotype. *Pediatr Dev Pathol* 12, 347–354
- Itzykson R, Fenaux P (2012): Optimizing hypomethylating agents in myelodysplastic syndromes. *Curr Opin Hematol* 19, 65–70
- Jin H, Wang X, Ying J, Wong AHY, Cui Y, Srivastava G, Shen ZY, Li EM, Zhang Q, Jin J et al. (2007): Epigenetic silencing of a Ca(2+)-regulated Ras GTPase-activating protein RASAL defines a new mechanism of Ras activation in human cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 12353–12358
- Kolfschoten IGM, van Leeuwen B, Berns K, Mullenders J, Beijersbergen RL, Bernards R, Voorhoeve PM, Agami R (2005): A genetic screen identifies PITX1 as a suppressor of RAS activity and tumorigenicity. *Cell* 121, 849–858
- Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, Hogg RJ, Perrone RD, Lau J, Eknoyan G (2003): National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med* 139, 137–147
- Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CWG, Wainscoat JS (1997): Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 350, 485–487

- Locatelli F, Pisoni RL, Combe C, Bommer J, Andreucci VE, Piera L, Greenwood R, Feldman HI, Port FK, Held PJ (2004): Anaemia in haemodialysis patients of five European countries: association with morbidity and mortality in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Nephrol Dial Transplant* 19, 121–132
- Macdougall IC, Coles GA, Williams JD, Davies ME, Hutton RD, Cochlin DL, Lewis NP, Fox K, Saunders MJ (1990): Long-term cardiorespiratory effects of amelioration of renal anaemia by erythropoietin. *Lancet* 335, 489–493
- MacLennan AH (1983): The role of relaxin in human reproduction. *Clin Reprod Fertil* 2, 77–95
- Madanat Y, Sekeres MA (2017): Optimizing the use of hypomethylating agents in myelodysplastic syndromes: Selecting the candidate, predicting the response, and enhancing the activity. *Semin Hematol* 54, 147–153
- Maddux FW, Shetty S, Del Aguila MA, Nelson MA, Murray BM (2007): Effect of erythropoiesis-stimulating agents on healthcare utilization, costs, and outcomes in chronic kidney disease. *Ann Pharmacother* 41, 1761–1769
- Meder B, Haas J, Sedaghat-Hamedani F, Kayvanpour E, Frese K, Lai A, Nietsch R, Scheiner C, Mester S, Bordalo DM et al. (2017): Epigenome-Wide Association Study Identifies Cardiac Gene Patterning and a Novel Class of Biomarkers for Heart Failure. *Circulation* 136, 1528–1544
- Mitin N, Rossman KL, Der CJ (2005): Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr Biol* 15, R563-R574
- Mohn F, Weber M, Rebhan M, Roloff TC, Richter J, Stadler MB, Bibel M, Schübeler D (2008): Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol Cell* 30, 755–766
- Mula-Abed WAS, Al Rasadi K, Al-Riyami D (2012): Estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR): A Serum Creatinine-Based Test for the Detection of Chronic Kidney Disease and its Impact on Clinical Practice. *Oman Med J* 27, 108–113
- Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DWY, Gale D, Forshew T, Piskorz AM, Parkinson C, Chin SF, Kingsbury Z, Wong ASC et al. (2013): Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 497, 108–112
- Parry L, Clarke AR (2011): The Roles of the Methyl-CpG Binding Proteins in Cancer. *Genes Cancer* 2, 618–630
- Ruggenti P, Cravedi P, Remuzzi G (2012): Mechanisms and treatment of CKD. *J Am Soc Nephrol* 23, 1917–1928
- Samuel CS, Zhao C, Bond CP, Hewitson TD, Amento EP, Summers RJ (2004): Relaxin-1-deficient mice develop an age-related progression of renal fibrosis. *Kidney Int* 65, 2054–2064
- Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K (2011): Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 11, 426–437
- Shaikh H, Aeddula NR: Anemia Of Chronic Renal Disease. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL) 2022
- Stenvinkel P (2001): The role of inflammation in the anaemia of end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 16 Suppl 7, 36–40

- Strutz F, Zeisberg M (2006): Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 17, 2992–2998
- Szczzech LA, Barnhart HX, Inrig JK, Reddan DN, Sapp S, Califf RM, Patel UD, Singh AK (2008): Secondary analysis of the CHOIR trial epoetin-alpha dose and achieved hemoglobin outcomes. *Kidney Int* 74, 791–798
- Tampe B, Zeisberg M (2014): Contribution of genetics and epigenetics to progression of kidney fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 29 Suppl 4, iv72-9
- Tampe B, Tampe D, Müller CA, Sugimoto H, LeBleu V, Xu X, Müller GA, Zeisberg EM, Kalluri R, Zeisberg M (2014): Tet3-mediated hydroxymethylation of epigenetically silenced genes contributes to bone morphogenic protein 7-induced reversal of kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 25, 905–912
- Tampe B, Tampe D, Zeisberg EM, Müller GA, Bechtel-Walz W, Koziolok M, Kalluri R, Zeisberg M (2015): Induction of Tet3-dependent Epigenetic Remodeling by Low-dose Hydralazine Attenuates Progression of Chronic Kidney Disease. *EBioMedicine* 2, 19–36
- Tampe D, Zeisberg M (2012): A primer on the epigenetics of kidney fibrosis. *Minerva Med* 103, 267–278
- Tao H, Huang C, Yang JJ, Ma TT, Bian EB, Zhang L, Lv XW, Jin Y, Li J (2011): MeCP2 controls the expression of RASAL1 in the hepatic fibrosis in rats. *Toxicology* 290, 327–333
- Unemori EN, Amento EP (1990): Relaxin modulates synthesis and secretion of procollagenase and collagen by human dermal fibroblasts. *J Biol Chem* 265, 10681–10685
- Walker SA, Kupzig S, Bouyoucef D, Davies LC, Tsuboi T, Bivona TG, Cozier GE, Lockyer PJ, Buckler A, Rutter GA et al. (2004): Identification of a Ras GTPase-activating protein regulated by receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> oscillations. *EMBO J* 23, 1749–1760
- Wu C, Morris JR (2001): Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science* 293, 1103–1105
- Xu X, Tan X, Tampe B, Nyamsuren G, Liu X, Maier LS, Sossalla S, Kalluri R, Zeisberg M, Hasenfuss G et al. (2015): Epigenetic balance of aberrant Rasal1 promoter methylation and hydroxymethylation regulates cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res* 105, 279–291
- Yang L, Besschetnova TY, Brooks CR, Shah JV, Bonventre JV (2010): Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nat Med* 16, 535–43
- Yin H, Blanchard KL (2000): DNA methylation represses the expression of the human erythropoietin gene by two different mechanisms. *Blood* 95, 111–119
- Zeisberg EM, Zeisberg M (2013): The role of promoter hypermethylation in fibroblast activation and fibrogenesis. *J Pathol* 229, 264–273
- Zeisberg M (2011): ANCA vasculitis meets epigenetics—closing in on the molecular roots of disease. *Nephrol Dial Transplant* 26, 1146–1148
- Zeisberg M, Neilson EG (2010): Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 21, 1819–1834
- Zeisberg M, Strutz F, Müller GA (2000): Role of fibroblast activation in inducing interstitial fibrosis. *J Nephrol* 13 Suppl 3, S111-120

## Danksagung

Mein Dank gilt meiner Doktormutter Fr. Prof. Dr. Elisabeth Zeisberg für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für ihre allzeit bestehende Ansprechbarkeit, kontinuierliche Betreuung und Unterstützung.

Hr. PD Dr. med. Björn Tampe möchte ich ebenfalls für sein Engagement, seinen stetigen Rat und seine fachkompetente Unterstützung, insbesondere bei der praktischen Umsetzung und Auswertung der Experimente, danken.

Für die Möglichkeit in seiner Abteilung promovieren zu dürfen, spreche ich Hr. Prof. Dr. med. Gerd Hasenfuß meinen Dank aus.

Für ihre Hilfestellungen und Erklärungen bedanke ich mich bei den medizinisch-technischen Assistentinnen Fr. Sarah Rinkleff, Fr. Anika Krüger und Fr. Annika Erdmann sowie bei Fr. Dr. med. Desiree Tampe. Meine Zeit in der Arbeitsgruppe von Fr. Prof. Dr. med. Elisabeth Zeisberg und Hr. Prof. Dr. med. Michael Zeisberg war sehr interessant, arbeitsintensiv und prägend, so dass ich allen Unterstützern in und außerhalb des Labors meinen Dank für ihr Mitwirken, ihre Korrekturen und jeglichen Beistand ausspreche.