

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

**Einfluss der RNA-Demethylase FTO auf
die Endothelin-1-induzierte
Hypertrophie im hiPSC-
Kardiomyozytenmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Alessa Isabella Anna Katharina Pommeranz

aus

Göttingen

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in Prof. Dr. med. K. Toischer

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. rer. nat. A. Fischer

Prüfungskommission

Referent/in Prof. Dr. med. K. Toischer

Ko-Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. A. Fischer

Datum der mündlichen Prüfung: 31.08.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Einfluss der RNA-Demethylase FTO auf die Endothelin-1-induzierte Hypertrophie im hiPSC-Kardiomyozytenmodell" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Herzinsuffizienz	1
1.2 Hypertrophie.....	2
1.2.1 Physiologische Hypertrophie.....	3
1.2.2 Pathologische Hypertrophie	3
1.3 Kardiales Remodeling	4
1.4 Epigenetik.....	5
1.5 N6-Methyladenosin (m ⁶ A)	5
1.5.1 METTL3 und der <i>Writer</i> -Komplex	7
1.5.2 FTO (<i>Eraser</i>).....	8
1.5.3 Bindungsproteine (<i>Reader</i>)	10
1.5.4 Einfluss von m ⁶ A auf die prä-mRNA-Prozessierung.....	10
1.5.5 Einfluss von m ⁶ A auf den mRNA-Export.....	11
1.5.6 Einfluss von m ⁶ A auf die mRNA-Struktur.....	11
1.5.7 Einfluss von m ⁶ A auf die mRNA-Stabilität und den mRNA-Abbau.....	11
1.5.8 Einfluss von m ⁶ A auf die Translation	11
1.6 Endothelin-1	12
1.7 Raf-MEK1/2-ERK1/2-Signalweg	13
1.8 ANP	14
1.9 Zielsetzung	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Differenzierung von Kardiomyozyten aus Stammzellen	16
2.2 Ernte der Kardiomyozyten	24
2.3 siRNA-Transfektion	25

2.4	Endothelin-1-Behandlung.....	26
2.5	Kombination der siRNA-Transfektion mit der Endothelin-1-Behandlung – 96-Stunden-Protokoll.....	26
2.6	Kombination der siRNA-Transfektion mit der Endothelin-1-Behandlung – 72-Stunden-Protokoll.....	27
2.7	Protein-Isolation	28
2.8	Bestimmung der Protein-Konzentration.....	28
2.9	SDS-PAGE und Western Blot.....	29
2.10	RNA-Isolation	34
2.11	RNA-Reinigung und -Konzentrationsbestimmung	36
2.12	cDNA-Synthese.....	38
2.13	qPCR.....	38
2.14	Immunfluoreszenz-Färbung und Zellgrößenmessung.....	41
3	Ergebnisse	44
3.1	Etablierung eines FTO- <i>Knock-Downs</i>	44
3.2	Kombination des FTO- <i>Knock-Downs</i> mit der Endothelin-1-Behandlung – Etablierung eines Versuchsprotokolls	46
3.3	Einfluss der Endothelin-1-Stimulation auf die Menge des FTO-Proteins.....	51
3.4	Einfluss des FTO- <i>Knock-Downs</i> auf die Endothelin-1-induzierte Hypertrophie.....	53
3.5	Einfluss des FTO- <i>Knock-Downs</i> auf die Endothelin-1-induzierte Synthese des Hypertrophie-Markers ANP	56
3.6	Einfluss des FTO- <i>Knock-Downs</i> auf die Synthese des ERK1/2-Proteins.....	58
3.7	Einfluss des FTO- <i>Knock-Downs</i> auf die m ⁶ A-Verteilung und -Menge.....	60
4	Diskussion.....	62
4.1	hiPSC-Kardiomyozytenmodell.....	62
4.2	Etablierung eines FTO- <i>Knock-Downs</i>	62
4.3	Endothelin-1-Stimulation	63
4.4	Einfluss des FTO- <i>Knock-Downs</i> auf die Endothelin-1-induzierte Hypertrophie.....	63

4.5	Einfluss des FTO- <i>Knock-Downs</i> auf die Endothelin-1-induzierte Synthese des Hypertrophie-Markers ANP	63
4.6	Einfluss des FTO- <i>Knock-Downs</i> auf den ERK1/2-MAPK-Signalweg	64
4.7	Einfluss des FTO- <i>Knock-Downs</i> auf m ⁶ A.....	64
4.8	Vergleich mit anderen Studien	66
4.9	Einfluss des FTO- <i>Knock-Downs</i> auf m ⁶ A _m	71
4.10	Einfluss der FTO-Expression auf die Expression anderer m ⁶ A-Regulatoren	71
4.11	FTO und ALKBH5	72
4.12	METTL3- und FTO-Expression bei Herzinsuffizienz	72
4.13	Schlussfolgerung und Ausblick.....	73
5	Zusammenfassung	75
6	Literaturverzeichnis	77

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: FTO- <i>Knock-Down</i> 48 Stunden nach der siRNA-Transfektion.....	45
Abbildung 2: FTO- <i>Knock-Down</i> 96 Stunden nach der siRNA-Transfektion.....	49
Abbildung 3: FTO- <i>Knock-Down</i> 72 Stunden nach der siRNA-Transfektion.....	51
Abbildung 4: Einfluss der ET-1-Stimulation auf die Menge des FTO-Proteins	52
Abbildung 5: Einfluss des FTO- <i>Knock-Downs</i> auf die Endothelin-1-induzierte Hypertrophie	49
Abbildung 6: Einfluss des FTO- <i>Knock-Downs</i> auf die Endothelin-1-induzierte ANP- Synthese	57
Abbildung 7: Einfluss des FTO- <i>Knock-Downs</i> auf die Menge des ERK1/2-Proteins	59
Abbildung 8: Einfluss des FTO- <i>Knock-Downs</i> auf die m ⁶ A-Verteilung und -Menge	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Fragestellungen der Arbeit	15
Tabelle 2: Differenzierungsprotokoll.....	18
Tabelle 3: Verwendete Zelllinien	19
Tabelle 4: Verwendete Kulturmedien.....	19
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen Zellkultur.....	21
Tabelle 6: Verwendete Materialien Zellkultur.....	21
Tabelle 7: Verwendete Geräte Zellkultur	22
Tabelle 8: Verwendete allgemeine Chemikalien, Puffer, Lösungen	22
Tabelle 9: Verwendete allgemeine Materialien	23
Tabelle 10: Verwendete allgemeine Geräte.....	24
Tabelle 11: Verwendete allgemeine Computerprogramme	24
Tabelle 12: Verwendete siRNAs	25
Tabelle 13: Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen siRNA-Transfektion.....	26
Tabelle 14: Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen Endothelin-1-Behandlung	26
Tabelle 15: Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen Protein-Isolation	28
Tabelle 16: Verwendete Geräte Protein-Isolation	28
Tabelle 17: Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen Protein- Konzentrationsbestimmung	29
Tabelle 18: Verwendete Materialien Protein-Konzentrationsbestimmung	29
Tabelle 19: Verwendete Geräte Protein-Konzentrationsbestimmung	29
Tabelle 20: Verwendete Computerprogramme Protein-Konzentrationsbestimmung	29
Tabelle 21: Primäre Antikörper Western Blot mit Verdünnung und sekundärem Antikörper....	31
Tabelle 22: Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen SDS-PAGE.....	31
Tabelle 23: Verwendete Materialien SDS-PAGE	32
Tabelle 24: Verwendete Geräte SDS-PAGE	32
Tabelle 25: Verwendete Antikörper Western Blot	32
Tabelle 26: Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen Western Blot.....	33
Tabelle 27: Verwendete Materialien Western Blot	33
Tabelle 28: Verwendete Geräte Western Blot	33
Tabelle 29: Verwendete Computerprogramme Western Blot	33
Tabelle 30: Schritte der RNA-Isolation.....	35

Tabelle 31: Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen RNA-Isolation	35
Tabelle 32: Schritte der RNA-Reinigung	37
Tabelle 33: Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen RNA-Reinigung	37
Tabelle 34: Verwendete Geräte RNA-Konzentrationsbestimmung	37
Tabelle 35: Schritte der reversen Transkription	38
Tabelle 36: Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen cDNA-Synthese.....	38
Tabelle 37: qPCR-Protokoll.....	39
Tabelle 38: Verwendete Primer qPCR.....	40
Tabelle 39: Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen qPCR	40
Tabelle 40: Verwendete Materialien qPCR	40
Tabelle 41: Verwendete Geräte qPCR.....	40
Tabelle 42: Verwendete Computerprogramme qPCR	40
Tabelle 43: Primäre Antikörper Immunfluoreszenz-Färbung mit Verdünnung und sekundärem Antikörper.....	42
Tabelle 44: Verwendete Antikörper Immunfluoreszenz-Färbung.....	42
Tabelle 45: Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen Immunfluoreszenz-Färbung	43
Tabelle 46: Verwendete Materialien Immunfluoreszenz-Färbung.....	43
Tabelle 47: Verwendete Geräte Immunfluoreszenz-Färbung.....	43
Tabelle 48: Verwendete Computerprogramme Immunfluoreszenz-Färbung und Zellgrößenmessung	43
Tabelle 49: Versuchsprotokoll für den FTO- <i>Knock-Down</i> mittels siRNA-Transfektion.....	44
Tabelle 50: Versuchsprotokoll für die Endothelin-1-Behandlung.....	47
Tabelle 51: 96-Stunden-Versuchsprotokoll für die Kombination des FTO- <i>Knock-Downs</i> mit der ET-1-Behandlung	47
Tabelle 52: 72-Stunden-Versuchsprotokoll für die Kombination des FTO- <i>Knock-Downs</i> mit der ET-1-Behandlung	48

Abkürzungsverzeichnis

ALKBH5	AlkB-Homolog 5
ANP	<i>atrial natriuretic peptide</i>
AT-II	Angiotensin-II
BCS	<i>bovine calf serum</i>
BNP	<i>brain natriuretic peptide</i>
CBLL1	<i>casitas B-lineage lymphoma-transforming sequence-like protein 1</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cGMP	3'-5'-zyklisches Guanosin-Monophosphat
DMEM	<i>dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DPBS	<i>dulbecco's phosphate buffered saline</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK1/2	extrazelluläres-Signal-regulierte Kinase1/2
ET	Endothelin
FTO	<i>fatt mass and obesity associated protein</i>
GATA4	GATA-Bindeprotein 4
GTP	Guanosintriphosphat
G-Protein	GTP-bindendes Protein
HEK293-Zellen	<i>human embryonic kidney 293 Zellen</i>
HFpEF	<i>heart failure with preserved ejection fraction</i>
HFrEF	<i>heart failure with reduced ejection fraction</i>
hiPSCs	<i>human induced pluripotent stem cells</i>
hiPSC-CMs	<i>human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes</i>
IWP2	Inhibitor der Wnt-Produktion 2
lncRNA	<i>long non-coding RNA</i>
MAPK	Mitogen-aktivierende Proteinkinase
MAPKK	Mitogen-aktivierende Proteinkinase-Kinase
MAPKKK	Mitogen-aktivierende Proteinkinase-Kinase-Kinase
MEK1/2	MAPK/ERK-Kinase1/2
METTL3	<i>methyltransferase like 3</i>
METTL14	<i>methyltransferase like 14</i>
miRNA	microRNA

mRNA	Messenger-RNA
m ⁶ A	N6-Methyladenosin
m ⁶ A _m	N6,2'-O-Dimethyladenosin
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Raf-1	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma 1</i>
RBM15	RNA-Bindemotiv-Protein 15
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rRNA	ribosomale RNA
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
sncRNA	<i>small non-coding RNA</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
TBST	<i>tris buffered saline</i> mit 0,1 % Tween
tRNA	Transfer-RNA
VIRMA	<i>vir like m6A methyltransferase associated</i>
WTAP	Wilms-Tumor-1-assoziiertes-Protein
YTHDC1	<i>YTH-domain-containing protein 1</i>
YTHDC2	<i>YTH-domain-containing protein 2</i>
YTHDF1	<i>YTH domain family member 1</i>
YTHDF2	<i>YTH domain family member 2</i>
YTHDF3	<i>YTH domain family member 3</i>
ZC3H13	Zinkfinger-CCCH-Domäne-enthaltendes Protein 13
3'UTR	3'-untranslatierte Region

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

Herzinsuffizienz kann den linken (Linksherzinsuffizienz), den rechten (Rechtsherzinsuffizienz) oder beide Ventrikel betreffen (globale Herzinsuffizienz) und ist ein klinisches Syndrom, bestehend aus bestimmten Symptomen wie z. B. Atemnot, Erschöpfung und Ödeme, das durch einen für den Sauerstoffbedarf des Körpers nicht ausreichenden kardialen Auswurf gekennzeichnet ist (Ponikowski et al. 2016; Savarese und Lund 2017). Das verminderte Schlagvolumen kann entweder durch eine eingeschränkte Pumpleistung oder eine verringerte Blutfüllung des Herzens bedingt sein (Savarese und Lund 2017). Daher werden aktuell zwei Arten von Herzinsuffizienz unterschieden: Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF = *heart failure with preserved ejection fraction*) und Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF = *heart failure with reduced ejection fraction*) (Chatterjee 2012; Ponikowski et al. 2016; Shimizu und Minamino 2016). Bei der HFpEF liegt eine diastolische Dysfunktion mit einer verstärkten Wandsteifigkeit vor, weshalb die Blutfüllung des Ventrikels beeinträchtigt ist. Da die systolische Funktion aber noch unbeeinträchtigt ist, bleibt der prozentuale Auswurf, also die Ejektionsfraktion, erhalten ($> 49\%$). Durch das verringerte Füllungsvolumen ist das absolute Schlagvolumen dennoch nicht ausreichend. Im Gegensatz dazu liegt bei der HFrEF ein erweiterter Ventrikel und eine systolische Funktionsstörung vor, die zu einer verminderten kontraktilen Funktion des Herzens führt. Folglich kommt es zu einer reduzierten Ejektionsfraktion ($< 40\%$), die ebenfalls ein verringertes absolutes Schlagvolumen bedingt. Häufig liegt bei der HFrEF zusätzlich auch eine diastolische Dysfunktion vor. Eine HFpEF kann in eine HFrEF übergehen und es existiert eine Grauzone zwischen beiden Formen, die als Herzinsuffizienz mit mittlerer Ejektionsfraktion (HFmrEF = *heart failure with mid-range ejection fraction*) bezeichnet wird. Bei dieser Übergangsform liegt ebenfalls sowohl eine diastolische als auch eine systolische Dysfunktion vor (Chatterjee 2012; Ponikowski et al. 2016; Savarese und Lund 2017).

Ein wichtiger pathophysiologischer Treiber der Herzinsuffizienz ist die neurohormonale Aktivierung. Das sympathische Nervensystem ist verstärkt aktiviert und die Konzentration an Katecholaminen erhöht. Zudem kommt es zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und es finden sich u. a. erhöhte Spiegel

von Endothelinen, Zytokinen und Vasopressin. Kompensatorisch steigen auch die Konzentrationen von den natriuretischen Peptiden und Stickstoffmonoxid (Chatterjee 2012).

Weltweit leiden über 26 Millionen Menschen an einer Herzinsuffizienz. Die Prävalenz ist in den letzten 20 Jahren angestiegen und dieser Trend wird sich auch in Zukunft fortsetzen, da die Bevölkerung zunehmend älter wird und die Krankheit am häufigsten ab einem Alter von 65 Jahren auftritt. Die Mortalität sowie die Morbidität sind hoch und die Lebensqualität gering (Savarese und Lund 2017). Die Herzinsuffizienz stellt somit eines der größten gesundheitlichen Probleme dar. Dementsprechend ist eine effektive Therapie dieser Erkrankung von höchster Wichtigkeit.

Die bisher beste medikamentöse Therapie der HFrEF ist die Hemmung der neurohormonalen Stimulation mittels Angiotensin-Inhibitoren, Betablockern und Aldosteron-Antagonisten. Diese Medikamente senken die Mortalität sowie die Morbidität und können die Progression abschwächen, aber nicht gänzlich aufhalten. Bei der HFpEF sind die genannten Medikamente nicht von Nutzen und es gibt bisher kaum therapeutische Möglichkeiten (Chatterjee 2012). Deshalb werden dringend weitere Therapieoptionen benötigt.

1.2 Hypertrophie

Der Weg zu einer Herzinsuffizienz beginnt meist mit einer Herzhypertrophie. Da Kardiomyozyten kurz nach der Geburt terminal differenziert sind, können sie auf eine erhöhte Vor- oder Nachlast nicht mit einer Zunahme ihrer Zellzahl, sondern nur mit einer Zunahme ihrer Größe reagieren. Diese Größenzunahme der einzelnen Kardiomyozyten führt zu einer Vergrößerung des Herzens und damit zu einer Herzhypertrophie (Nakamura und Sadoshima 2018). Auf molekularer Ebene wird dieser Prozess durch eine erhöhte Expression bestimmter Gene und eine verstärkte Synthese ausgewählter Proteine vermittelt (Hannan et al. 2003).

Die Herzhypertrophie lässt sich in eine physiologische und in eine pathologische Form einteilen. Diese wiederum lassen sich jeweils weiter unterteilen in eine konzentrische und eine exzentrische Form. Beide Hypertrophiearten entstehen zunächst als eine adaptive Reaktion auf kardialen Stress, um die Durchblutung der peripheren Organe auch bei

erhöhter Arbeitsbelastung des Herzens aufrechterhalten zu können. Durch die Zunahme an Sarkomereinheiten wird die Kontraktilität entweder dauerhaft (physiologische Hypertrophie) oder nur anfänglich (pathologische Hypertrophie) erhöht, um die kardiale Leistungsfähigkeit zu steigern. Welche Form der Hypertrophie entsteht, hängt davon ab, ob es sich um physiologische oder pathologische Stressstimuli handelt. Die physiologische und die pathologische Hypertrophie unterscheiden sich in ihrem kardialen Phänotyp, ihrer Prognose und ihren zugrundeliegenden molekularen Mechanismen (Shimizu und Minamino 2016; Nakamura und Sadoshima 2018).

1.2.1 Physiologische Hypertrophie

Die physiologische Hypertrophie geht nur mit einer leichten Zunahme der Herzmasse (10 – 20 %) einher und ist gekennzeichnet durch ein individuelles Kardiomyozytenwachstum, sowohl in der Länge als auch in der Breite, mit normalem Längen-Breiten-Verhältnis. Die Herzfunktion ist erhalten oder sogar gesteigert. Strukturelle Veränderungen wie eine interstitielle Fibrose und Zelltod treten nicht auf, aber die Angiogenese ist proportional zum Wachstum der Kardiomyozyten verstärkt. Die Expression von Genen wie ANP (= *atrial natriuretic peptide*, deutsch: atriales natriuretisches Peptid) und BNP (= *brain natriuretic peptide*, deutsch: natriuretisches Peptid des Gehirns), welche als Marker der pathologischen Hypertrophie gelten, ist entweder unverändert oder sogar verringert. Ebenfalls unverändert ist die Genexpression von Ca^{2+} -verarbeitenden Proteinen. Die bei der physiologischen Hypertrophie aktivierten Signalwege werden u. a. durch VEGF (= *vascular endothelial growth factor*, deutsch: vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor), PDGF (= *platelet-derived growth factor*, deutsch: Blutplättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktor) und Insulin/IGF1 (= *insulin-like growth factor 1*, deutsch: insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1) induziert. Als prognostisch wichtige Unterscheidungsmerkmale zur pathologischen Hypertrophie sind die vollständige Reversibilität und die niemals stattfindende Progression zur Herzinsuffizienz zu nennen. Der Reiz, welcher zu einer physiologischen Hypertrophie führt, ist sportliches Training. Dabei führt die Drucküberlastung/erhöhte Nachlast beim Krafttraining zu einer konzentrischen physiologischen Hypertrophie, während die Volumenüberlastung/erhöhte Vorlast beim Ausdauertraining eine exzentrische physiologische Hypertrophie erzeugt (Shimizu und Minamino 2016; Nakamura und Sadoshima 2018).

1.2.2 Pathologische Hypertrophie

Die pathologische Hypertrophie ist zunächst als kompensatorische Reaktion zu sehen. Sie beginnt meist mit einer konzentrischen Hypertrophie, entstehend durch ein Wachstum der einzelnen Kardiomyozyten, vor allem in der Breite. Das konzentrische Wachstum wird durch eine Drucküberlastung bzw. eine erhöhte Nachlast bedingt. Dieses Stadium ist häufig mit einer diastolischen Dysfunktion verbunden, welche sich als HFpEF äußert. Im Laufe der Zeit schreitet diese Hypertrophie durch Längenwachstum der Herzmuskelzellen zu einer exzentrischen Hypertrophie fort, die als Kammerdilatation mit Wandverdünnung zu verstehen ist. Dadurch kommt es zu einer systolischen kontraktile Dysfunktion und das Stadium der HFrEF ist erreicht. Ein exzentrisches Wachstum kann auch direkt durch eine Volumenüberlastung bzw. eine erhöhte Vorlast entstehen. Während die physiologische Hypertrophie die Herzfunktion also erhält oder sogar verbessert, führt die pathologische Hypertrophie bei ihrem Fortschreiten zu Herzinsuffizienz, Arrhythmien und letztlich zum Tod. Weiterhin geht die pathologische Hypertrophie mit einer interstitiellen Fibrose, Zelltod und einer gestörten und insuffizienten Angiogenese einher. Zudem ist die Genexpression von Ca^{2+} -verarbeitenden Proteinen verändert und die von Hypertrophie markern wie ANP und BNP erhöht. Auch die aktivierten Signalwege unterscheiden sich von jenen der physiologischen Hypertrophie. Die bei der pathologischen Hypertrophie aktivierten Signalwege werden u. a. durch AT-II (= Angiotensin-II), ET-1 (= Endothelin-1) und Katecholamine induziert. Stimuli, welche zu einer pathologischen Hypertrophie führen, sind beispielsweise eine chronische Hypertonie, ein Myokardinfarkt, Herzklappenerkrankungen wie die Aortenklappenstenose, Kardiomyopathien oder Speicherkrankheiten. Zudem sind Diabetes Mellitus und Adipositas wichtige mit pathologischer Hypertrophie und Herzinsuffizienz assoziierte Komorbiditäten (Shimizu und Minamino 2016; Nakamura und Sadoshima 2018).

1.3 Kardiales Remodeling

Die molekularen, zellulären und interstitiellen Umbauprozesse auf dem Weg vom gesunden Herzen über eine pathologische Hypertrophie bis hin zu einer Herzinsuffizienz werden als kardiales *Remodeling* (deutsch: Umbau) bezeichnet (Azevedo et al. 2015). Auf molekularer Ebene kommt es zur Aktivierung von intrazellulären Signalwegen durch neurohormonale Stimulation und zu Genexpressionsänderungen, sowie zu epigenetischen Veränderungen (Azevedo et al. 2015; Berezin 2016). Daraus resultierend kommt

es auf zellulärer Ebene zu Zelltod, Veränderungen kontraktiler Proteine und des Calcium-Transportsystems sowie zu einem veränderten Energiestoffwechsel mit mitochondrialer Dysfunktion und Erzeugung von oxidativem Stress. Interstitiell kommt es zur Fibrose, kombiniert mit der Zerstörung der normalen Kollagenstruktur, und zu entzündlichen Veränderungen (Azevedo et al. 2015).

1.4 Epigenetik

Die Epigenetik umfasst jede phänotypische Veränderung, die nicht von der DNA(= *desoxyribonucleic acid*, deutsch: Desoxyribonukleinsäure)-Sequenz abhängig ist (Berezin 2016; Devaux und Nossent 2020). Zum einen kann eine phänotypische Veränderung durch eine Änderung in der Regulation der Genexpression hervorgerufen werden. Diese DNA-Epigenetik umfasst die DNA-Methylierung, Histonmodifikationen, die ATP(= Adenosintriphosphat)-abhängige Chromatin-Remodellierung und die Regulation durch miRNAs (= microRNAs) (Berezin 2016).

Zum anderen kann eine phänotypische Veränderung auch durch eine Änderung in der Regulation des RNA(= *ribonucleic acid*, deutsch: Ribonukleinsäure)-Metabolismus hervorgerufen werden. Dieser Bereich der Epigenetik wird als Epitranskriptomik bezeichnet. Epitranskriptomische Veränderungen können verschiedene Arten von RNAs betreffen und werden durch posttranskriptionale Modifikationen vermittelt (Peer et al. 2017).

Epigenetische Veränderungen, darunter insbesondere auch die epitranskriptomischen, scheinen eine wesentliche pathophysiologische Rolle bei der Entstehung einer Hypertrophie bis hin zu einer Herzinsuffizienz zu spielen (Berezin 2016; Longenecker et al. 2020). Daher ist es wichtig, diese epigenetischen Veränderungen bei krankhaften Prozessen wie der Herzinsuffizienz zu erforschen und zu verstehen. Durch dieses Wissen könnten sich zukünftig neue Therapiemöglichkeiten ergeben.

1.5 N6-Methyladenosin (m⁶A)

Es sind über 150 posttranskriptionale Modifikationen von RNAs bekannt, welche in vielen verschiedenen Arten von RNA vorkommen, darunter Messenger-RNAs (mRNAs), Transfer-RNAs (tRNAs), ribosomale RNAs (rRNAs), kleine nicht-kodierende RNAs (sncRNAs = *small non-coding RNAs*) und lange nicht-kodierende RNAs (lncRNAs =

long non-coding RNAs) (Yang et al. 2018). Diese Modifikationen regulieren die RNA-Prozessierung und den RNA-Metabolismus, indem sie das alternative Spleißen, den Export, die Translation, die Stabilität und den Abbau der RNAs beeinflussen (Yang et al. 2018; Zaccara et al. 2019).

Die Methylierung von Adenosin am Stickstoff an Position 6, N6-Methyladenosin (m^6A), ist die häufigste Modifikation in mRNAs von Säugetieren (Yang et al. 2018; Rajacka et al. 2019; Zaccara et al. 2019). Es wurden über 10.000 m^6A -Peaks in mehr als 25 % der menschlichen Transkripte entdeckt (Yang et al. 2018). Die durchschnittliche Häufigkeit von m^6A in mRNA beträgt ein bis drei m^6A -Reste pro Transkript. Es gibt aber auch mRNAs mit 20 oder mehr m^6A -Stellen (Zaccara et al. 2019). N6-Methyladenosin findet sich außerdem noch in lncRNAs, rRNAs, tRNAs und in sncRNAs (Fu et al. 2014). Die m^6A -Modifikation spielt eine wesentliche Rolle bei Entwicklungsprozessen, der Festlegung des Zellschicksals (Zaccara et al. 2019) und auch bei vielen Erkrankungen wie der Herzinsuffizienz (Berulava et al. 2020; Longenecker et al. 2020).

N6-Methyladenosin tritt jeweils in bestimmten Bereichen der mRNA auf (Zaccara et al. 2019). Stellen mit m^6A können nahe Stopp-Codons, in der 3'-untranslatierten Region (3'UTR), in der 5'-untranslatierten Region (5'UTR) und in der codierenden Region gefunden werden (Yang et al. 2018; Zaccara et al. 2019). Zudem befindet sich die m^6A -Modifikation innerhalb der RNA in dem Konsensus-Motiv DRACH (D = A, G oder U; R = A oder G; H = A, U oder C). Dieses Motiv taucht ungefähr alle 57 Nukleotide in mRNA auf. Obwohl es folglich viele potenzielle Methylierungsstellen gibt, sind nur wenige der DRACH-Sequenzen tatsächlich methyliert. Zudem sind trotz des ubiquitären Auftretens der DRACH-Sequenz nur bestimmte mRNAs methyliert. Dies spricht für eine Orts- und Transkriptspezifität der m^6A -Methylierung, aber die genaue Grundlage dafür ist noch wenig erforscht. Einige mögliche Regulationsmechanismen wurden aber bereits aufgedeckt, wie z. B. die Rekrutierung des *Writer*(deutsch: Schreiber)-Komplexes durch Transkriptionsfaktoren an spezifische Promotoren, die Rekrutierung des *Writer*-Komplexes durch Verlangsamung der RNA-Polymerase II in bestimmten Bereichen der mRNA oder die Rekrutierung des *Writer*-Komplexes durch RNA-Bindeproteine (Slobodin et al. 2017; Zaccara et al. 2019).

N⁶-Methyladenosin ist eine dynamische Modifikation und wird durch das Zusammenspiel seiner Methyltransferasen (*Writer*), Demethylasen (*Eraser*, deutsch: Radierer) und Bindungsproteine (*Reader*, deutsch: Leser) reguliert (Yang et al. 2018; Zaccara et al. 2019).

1.5.1 METTL3 und der *Writer*-Komplex

Die Bildung von m⁶A in mRNA wird von einem Mehrkomponenten-Methyltransferase-Komplex (*Writer*-Komplex) katalysiert. Dieser besteht aus METTL3 (= *methyltransferase like 3*, deutsch: Methyltransferase-ähnlich 3), METTL14 (= *methyltransferase like 14*, deutsch: Methyltransferase-ähnlich 14), WTAP (= Wilms-Tumor-1-assoziiertes-Protein), VIRMA (= *vir like m6A methyltransferase associated*, deutsch: vir-ähnlich m⁶A-Methyltransferase assoziiert), RBM15 (RNA-Bindemotiv-Protein 15), ZC3H13 (Zinkfinger-CCCH-Domäne-enthaltendes Protein 13) und CBL1 (= *casitas B-lineage lymphoma-transforming sequence-like protein 1*, deutsch: Casitas-B-Linie-Lymphom-transformierend-sequenzähnliches Protein 1) (Yang et al. 2018; Zaccara et al. 2019). Das Anfügen der Methylgruppe findet ko-transkriptional im Zellkern statt (Zaccara et al. 2019).

METTL3 fungiert als katalytische Untereinheit und ist damit die Hauptkomponente des *Writer*-Komplexes, der in Kernflecken lokalisiert ist, allerdings findet sich METTL3 auch in geringeren Mengen im Zytoplasma. Die METTL3-Methyltransferase ist an der Regulation wichtiger biologischer Prozesse wie der Embryonalentwicklung, der Zellreprogrammierung und der Spermatogenese beteiligt. Dabei scheint METTL3 für die Embryonalentwicklung eine essenzielle Rolle zu spielen, da seine Deletion zu einer frühen embryonalen Letalität bei Mäusen führt. Das METTL3-Protein ist hochkonserviert und es finden sich Homologe in verschiedenen Spezies. Für die Erkennung der Ziel-RNA-Sequenz sind zwei Zinkfingerdomänen von METTL3 zuständig (Yang et al. 2018).

METTL3 und METTL14 bilden gemeinsam ein Heterodimer. METTL14 ist inaktiv und dient als allosterischer Aktivator, der die katalytische Aktivität von METTL3 verstärkt. Zudem enthält METTL14 die RNA-Bindungsstelle. METTL14 spielt genau wie METTL3 eine wesentliche Rolle bei vielen biologischen Prozessen.

WTAP, VIRMA, RBM15 (und sein Paralog RBM15B), ZC3H13 und CBL1 dienen als zusätzliche Adapterproteine im m⁶A-*Writer*-Komplex (Yang et al. 2018; Zaccara et al. 2019). Möglicherweise existieren auch noch weitere, bisher unentdeckte Komponenten des *Writer*-Komplexes (Yang et al. 2018). Über die Regulation der Expression und Aktivität von METTL3 und seinem *Writer*-Komplex ist bisher nichts bekannt.

Neben dem METTL3-*Writer*-Komplex existieren noch drei weitere Methyltransferasen im Säugetiergenom, die m⁶A in verschiedenen Arten von RNA erzeugen können. ZCCHC4 (= *Zinc Finger CCHC-type containing 4*, deutsch: Zinkfinger-CCHC-Typ-enthaltend 4) und der METTL5-TRMT112(= *Methyltransferase like 5, tRNA Methyltransferase Subunit 11-2*, deutsch: Methyltransferase-ähnlich 5, tRNA-Methyltransferase-Untereinheit 11-2)-Komplex katalysieren die Bildung von m⁶A in rRNA, während METTL16 m⁶A in snRNA (= *small nuclear RNA*, deutsch: kleine nukleäre RNA) und in anderen nicht-kodierenden RNAs sowie in einer kleinen Menge von mRNAs erzeugen kann (Zaccara et al. 2019).

1.5.2 FTO (*Eraser*)

Die Rückbildung von m⁶A zu Adenosin (A) in mRNA und snRNA wird durch die Demethylase FTO (= *fat mass and obesity associated protein*, deutsch: Fettmasse- und Fettleibigkeit-assoziiertes Protein) katalysiert (Jia et al. 2011; Wei et al. 2018). FTO gehört zur konservierten Familie der AlkB-Dioxygenasen. Im Säugetiergenom sind mindestens neun Homologe dieser Familie zu finden: AlkB-Homolog 1-8 und FTO (Rajacka et al. 2019). Das FTO-Protein wurde zunächst mit erhöhter Fettmasse und Fettleibigkeit in Verbindung gebracht. Auch onkogene Effekte von FTO sind bekannt, z. B. beim Glioblastom oder der akuten myeloischen Leukämie (AML) (Yang et al. 2018). Zudem scheint es für die allgemeine und neurologische Entwicklung und für die Energiehomöostase eine wichtige Rolle zu spielen, da Mäuse mit FTO-Deletion zwar lebensfähig sind, aber eine postnatale Wachstumsretardierung, neuronale Defekte, Lern- und Gedächtnisstörungen, eine Verringerung des Fettgewebes und eine geringe Körpermasse aufweisen (Fischer et al. 2009; Rajacka et al. 2019). FTO wird in allen Geweben exprimiert, am stärksten im Gehirn (Gerken et al. 2007; Boissel et al. 2009). Auch im Herzen scheint FTO eine besondere Rolle zu spielen, da eine FTO-*loss-of-function*-Mutation (deutsch: FTO-Verlust-der-Funktion-Mutation) beim Menschen zu einer schweren Wachstumsretardierung und multiplen Malformationen führt, zu denen

auch Ventrikelseptum- und atrioventrikuläre Defekte sowie die hypertrophe Kardiomyopathie gehören (Boissel et al. 2009). Zudem hat FTO im Herzen die höchste basale Expression von allen m⁶A-Regulatoren und die FTO-Expression von Kardiomyozyten ist höher als die von Nicht-Myozyten des Herzens (Mathiyalagan et al. 2019). Innerhalb der Zelle ist FTO im Zellkern in Kernflecken lokalisiert, findet sich aber auch im Zytoplasma (Jia et al. 2011; Gulati et al. 2014). Daneben existiert noch eine mobile FTO-Fraktion, die zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma hin- und herpendelt (Gulati et al. 2014). Wie die FTO-Expression und -Aktivität reguliert wird, ist bisher nicht bekannt.

Die Demethylaseaktivität von FTO wurde ursprünglich gegenüber N³-Methylthymidin (3-meT) in einzelsträngiger DNA und gegenüber N³-Methyluridin (3-meU) in einzelsträngiger RNA in vitro entdeckt (Gerken et al. 2007; Jia et al. 2008), doch schließlich wurde m⁶A als Hauptsubstrat von FTO in vivo identifiziert (Jia et al. 2011). Allerdings zeigt FTO auch eine beachtliche Demethylaseaktivität gegenüber N^{6,2'}-O-Dimethyladenosin (m⁶A_m) in mRNA und snRNA (Mauer et al. 2017; Wei et al. 2018). Dabei wird m⁶A_m zu 2'-O-Methyladenosin (A_m) demethyliert. Die m⁶A_m-Modifikation findet sich in mRNA ausschließlich am ersten kodierenden Nukleotid nach der 7-Methylguanosin-Cap-Struktur (m⁷G-Cap) und kommt in vielen Transkripten vor (Wei et al. 1975). Die bisher einzig bekannte Funktion von m⁶A_m in mRNA ist die Erhöhung der Stabilität (Mauer et al. 2017). Die Demethylierung von m⁶A_m in mRNA findet hauptsächlich im Zytoplasma statt, während die von m⁶A im Zellkern stattfindet. Darüber hinaus kann FTO N¹-Methyladenosin (m¹A) in tRNA demethylieren (Wei et al. 2018). Obwohl FTO also verschiedene Modifikationen demethylieren kann, scheint es m⁶A als Substrat zu favorisieren (Zhang et al. 2019). Die Demethylaseaktivität von FTO ist α -Ketoglutarat-, Fe²⁺- und sauerstoffabhängig (Gerken et al. 2007). Zudem entstehen bei der Oxidation von m⁶A zu A das Zwischenprodukt N⁶-Hydroxymethyladenosin (hm⁶A) und N⁶-Formyladenosin (f⁶A) als weiter oxidiertes Produkt (Fu et al. 2013).

Neben FTO existiert noch eine weitere mRNA-m⁶A-Demethylase: ALKBH5 (= AlkB-Homolog 5). ALKBH5 wird besonders stark in den Hoden exprimiert und ist wichtig für die Spermatogenese und Fruchtbarkeit. Zudem wurden für ALKBH5 auch onkogene Effekte nachgewiesen, z. B. beim Glioblastom oder bei Brustkrebs (Yang et al. 2018; Zaccara et al. 2019).

1.5.3 Bindungsproteine (*Reader*)

Die Effekte der m⁶A-Modifikation werden zum Teil über Bindungsproteine, auch *Reader* genannt, vermittelt. Zu den m⁶A-*Readern* gehört die Familie der YTH-Domäne-enthaltenden Proteine: YTHDC1 (= *YTH-domain-containing protein 1*, deutsch: YTH-Domäne-enthaltendes Protein 1), YTHDC2 (= *YTH-domain-containing protein 2*, deutsch: YTH-Domäne-enthaltendes Protein 2), YTHDF1 (= *YTH domain family member 1*, deutsch: YTH-Domäne-Familienmitglied 1), YTHDF2 (= *YTH domain family member 2*, deutsch: YTH-Domäne-Familienmitglied 2) und YTHDF3 (= *YTH domain family member 3*, deutsch: YTH-Domäne-Familienmitglied 3). YTHDC1 findet sich im Zellkern, YTHDF1 – 3 im Zytoplasma und YTHDC2 findet sich sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma (Yang et al. 2018; Zaccara et al. 2019). YTHDC1 wurde mit der Regulation des Spleißens und des nukleären Exports von m⁶A-mRNAs in Verbindung gebracht; zudem bindet es m⁶A in nicht-kodierenden RNAs (ncRNAs = *non-coding RNAs*). YTHDF1 fördert die Translation von m⁶A-mRNAs, YTHDF2 den Abbau, YTHDF3 sowohl die Translation als auch den Abbau. YTHDC2 fördert ebenfalls sowohl die Translation als auch den Abbau von m⁶A-mRNAs (Zaccara et al. 2019).

Des Weiteren binden einige Proteine m⁶A nicht direkt, sondern die Modifikation löst einen strukturellen *Switch* (deutsch: Wechsel) der RNA zu einer linearen, ungefalteten Form aus, was den RNA-Bindungsproteinen einen besseren Zugang ermöglicht. Zu diesen Proteinen gehören HNRNPA2B1 (= *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2B1*, deutsch: heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein A2B1), HNRNPC (= *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C*, deutsch: heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein C), und HNRNPG (= *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G*, deutsch: heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein G). Darüber hinaus wurden noch einige weitere Proteine wie z.B. FMRP (= *fragile X retardation protein*, deutsch: fragiles-X-Retardierungsprotein) als m⁶A-*Reader* diskutiert (Yang et al. 2018; Zaccara et al. 2019).

1.5.4 Einfluss von m⁶A auf die prä-mRNA-Prozessierung

N⁶-Methyladenosin kann die prä-mRNA-Prozessierung und das alternative Spleißen modulieren. Die Lokalisation von *Writern*, *Erasern* und *Readern* in Kernflecken, die mit Spleißfaktoren angereichert sind und als Orte des Spleißens dienen, unterstützt die Annahme, dass die m⁶A-Modifikation eine wichtige Rolle beim Spleißen spielt. Ebenso

unterstützend ist das Vorkommen von m⁶A in Introns, welche beim Spleißen herausgeschnitten werden und in der reifen mRNA nicht mehr vorhanden sind (Yang et al. 2018). Allerdings scheint m⁶A nur einen Teil der Spleißereignisse zu beeinflussen, da einige m⁶A-enthaltenden mRNAs bei Fehlen von METTL3 genauso gespleißt werden wie zuvor (Ke et al. 2017). Daher ist m⁶A vermutlich nur für eine kleine Menge von Transkripten von wesentlicher funktioneller Bedeutung für das Spleißen.

1.5.5 Einfluss von m⁶A auf den mRNA-Export

Der Export von mRNAs aus dem Zellkern kann ebenfalls durch m⁶A beeinflusst werden (Yang et al. 2018). Dabei scheint m⁶A eine fördernde Wirkung auf den Export zu haben. Diese m⁶A-abhängige Förderung ist zum Teil über YTHDC1 vermittelt. Allerdings ist m⁶A für den Export nicht zwingend erforderlich, da viele mRNAs kein m⁶A enthalten und trotzdem problemlos aus dem Zellkern exportiert werden (Zaccara et al. 2019).

1.5.6 Einfluss von m⁶A auf die mRNA-Struktur

N⁶-Methyladenosin kann die Struktur von RNAs hin zu einer linearen, ungefalteten Form verändern (*m⁶A-Switch*), wodurch sich die Bindungsaffinität von RNA-bindenden Proteinen verbessern kann. Zudem kann m⁶A auch bestimmte RNA-bindende Proteine verdrängen, wenn es an ihrer Bindungsstelle auftritt (Zaccara et al. 2019).

1.5.7 Einfluss von m⁶A auf die mRNA-Stabilität und den mRNA-Abbau

Auch die Speicherung, die Stabilität und der Abbau von mRNAs wird durch m⁶A beeinflusst (Yang et al. 2018). Die Anwesenheit von m⁶A kann zur Instabilität von mRNAs führen. N⁶-Methyladenosin-enthaltende mRNAs haben kürzere Halbwertszeiten als mRNAs ohne m⁶A und das Fehlen von METTL3 führt zu einer Verlängerung ihrer Halbwertszeiten (Ke et al. 2017). Die durch m⁶A hervorgerufene kürzere Halbwertszeit wird zum Teil durch YTHDF2 vermittelt. YTHDF2 führt die m⁶A-mRNAs Abbauorten im Zytoplasma zu (Wang et al. 2014). Allerdings kann die Stabilität von m⁶A-mRNAs, vermittelt durch RNA-bindende Proteine, auch erhöht werden (Zaccara et al. 2019).

1.5.8 Einfluss von m⁶A auf die Translation

Die m⁶A-Modifikation kann Einfluss auf die Translation der Transkripte nehmen (Yang et al. 2018). Dabei kann m⁶A sowohl einen fördernden (Zaccara et al. 2019) als auch einen hemmenden Einfluss auf die Translation haben (Slobodin et al. 2017). N⁶-Methyladenosin scheint die Translation sowohl direkt (Meyer et al. 2015) als auch über

Reader-Proteine vermittelt (Wang et al. 2015; Zaccara et al. 2019) regulieren zu können. Ob die Translation gehemmt oder gefördert wird, hängt vermutlich vom Ort der m⁶A-Methylierung ab. Sich in der codierenden Region befindliches m⁶A könnte eher eine hemmende Wirkung haben, m⁶A in den untranslatierten Regionen hingegen eher eine fördernde (Slobodin et al. 2017). Zudem scheint auch der m⁶A-*Writer* METTL3 die Translation unabhängig von seiner Methyltransferase-Aktivität fördern zu können (Lin et al. 2016).

1.6 Endothelin-1

Das 21-Aminosäuren-Peptid Endothelin-1 ist eins von drei Endothelinen (ET-1, ET-2 und ET-3) im menschlichen Körper. Endothelin-1 wird hauptsächlich von vaskulären Endothelzellen produziert und sezerniert, aber auch Kardiomyozyten und eine Vielzahl von anderen Zellen sind zur Produktion von ET-1 fähig. Das *ET-1*-Gen kodiert für Präproendothelin-1. Durch verschiedene Peptidasen wird Präproendothelin-1 über Proendothelin-1 und Big-Endothelin-1 zum biologisch aktiven ET-1 gespalten. Die Produktion von ET-1 in Endothelzellen wird z. B. durch AT-II und Vasopressin stimuliert und durch Scherstress reguliert. Die Wirkungen von ET-1 im Körper sind vielfältig. Endothelin-1 wirkt als Vasokonstriktor, sowohl im Körper- als auch im Lungenkreislauf, und sorgt für einen anhaltenden Anstieg des Blutdrucks (Miyachi und Masaki 1999; Miyachi und Sakai 2019). Zudem sorgt das Peptid auch für die Kontraktion nichtvaskulärer glatter Muskulatur (z.B. glatte Bronchialmuskulatur) und für die Freisetzung von ANP und einigen anderen Hormonen im Körper. Am Herzen erhöht ET-1 unmittelbar die Kontraktilität, langfristig induziert es eine kardiale Hypertrophie und Zellschädigung (Ito et al. 1991; Miyachi und Masaki 1999; Archer et al. 2017; Miyachi und Sakai 2019). Vermittelt werden die ET-1-Wirkungen über zwei Endothelin-Rezeptoren (ET_A und ET_B). Der ET_A-Rezeptor bevorzugt ET-1 gegenüber ET-2 und ET-3, der ET_B-Rezeptor zeigt hingegen die gleiche Affinität für alle drei Peptide (Miyachi und Masaki 1999; Miyachi und Sakai 2019). Die Induktion der Hypertrophie und die Stimulation der ANP-Sekretion werden durch den ET_A-Rezeptor vermittelt (Yuan et al. 2016; Archer et al. 2017). Die Endothelin-Rezeptoren sind an verschiedene GTP(= Guanosintriphosphat)-bindende-Proteine gekoppelt und aktivieren so viele verschiedene intrazelluläre Signalwege. Zu den aktivierten Signalwegen gehören beispielsweise der PLC(= Phospholipase C)- und der ERK1/2-MAPK(= extrazelluläres-Signal-regulierte Kinase1/2, Mitogen-aktivierende Proteinkinase)-Signalweg (Miyachi und Masaki 1999;

Miyauchi und Sakai 2019). Letzterer vermittelt die hypertrophen Effekte von ET-1 auf Herzmuskelzellen (Yue et al. 2000; Archer et al. 2017) durch eine gesteigerte Genexpression von muskelspezifischen Proteinen wie Myosin-leichte-Kette 2, α -Aktin und Troponin I (Ito et al. 1991; Archer et al. 2017). Die verstärkte Bildung von ANP wird ebenfalls durch den ERK1/2-MAPK-Signalweg induziert (Yue et al. 2000; Archer et al. 2017). Dabei führt die Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs durch ET-1 zur Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors GATA-4 (= GATA-Bindeprotein 4) (Kitta et al. 2001; Liang et al. 2001). GATA-4 bildet mit SRF (= *serum response factor*, deutsch: Serum-Antwort-Faktor) einen Komplex, der an die Promotoren der Ziel-Gene wie ANP bindet und die Transkription initiiert (Morin et al. 2001; Temsah und Nemer 2005).

Bei Herzinsuffizienz ist der Plasmaspiegel von ET-1 erhöht. Dafür ist u. a. eine gesteigerte Produktion in Herzmuskelzellen verantwortlich. Eine autokrine oder parakrine Stimulation der Zellen ist daher denkbar. Die durch ET-1 vermittelten Effekte sorgen kurzzeitig für eine kompensatorische Kontraktilitätssteigerung, auf lange Sicht führen sie allerdings zur Progression der Erkrankung (Miyauchi und Masaki 1999; Miyauchi und Sakai 2019).

1.7 Raf-MEK1/2-ERK1/2-Signalweg

Der ERK1/2-Signalweg ist einer von drei MAPK-Hauptwegen. Die anderen beiden Wege beinhalten die p38-Kinasen und die c-Jun-N-terminalen Kinasen. MAPK-Signalwege bestehen aus mindestens drei Kinase-Leveln. In der Kaskade wird die Aktivierung der jeweils nächsten Stufe über eine Phosphorylierung vermittelt. Das erste Level, die MAPKKK (= Mitogen-aktivierende Proteinkinase-Kinase-Kinase), wird durch ein G-Protein (= GTP-bindendes Protein) aktiviert, welches an einen Rezeptor gekoppelt ist. Daraufhin aktiviert die MAPKKK das zweite Level, die MAPKK (= Mitogen-aktivierende Proteinkinase-Kinase), und diese wiederum das dritte Level, die MAPK (Kehat und Molkentin 2010).

Im Falle des ERK1/2-Signalwegs aktiviert das G-Protein Ras (= Rattensarkom) die MAPKKK Raf-1 (= *rapidly accelerated fibrosarcoma 1*, deutsch: schnell beschleunigtes Fibrosarkom 1, auch C-Raf genannt), Raf-1 aktiviert die MAPKK MEK1/2 (= MAPK/ERK-Kinase1/2) und diese wiederum die MAPK ERK1/2. ERK1/2 transloziert

in den Zellkern und phosphoryliert und aktiviert Transkriptionsfaktoren wie GATA-4, wodurch die Transkription bestimmter Gene angeregt wird. Die Inaktivierung der Kinasen wird über verschiedene Phosphatasen vermittelt. Das ERK- und das MEK-Protein liegen jeweils in zwei Isoformen vor, welche ähnliche Sequenzen haben und von denen angenommen wurde, funktionell redundant zu sein. Es gibt jedoch Hinweise auf funktionelle Unterschiede zwischen den Isoformen, allerdings ist darüber bisher noch wenig bekannt (Kehat und Molkentin 2010).

Der ERK1/2-Signalweg wird in Herzmuskelzellen als Antwort auf verschiedenste Stressstimuli aktiviert und ist an der Entstehung einer Hypertrophie beteiligt (Kehat und Molkentin 2010). Durch die Aktivierung des Signalwegs entsteht eine konzentrische Hypertrophie, während die Deletion von ERK1/2 bei Stressstimulation zu einer exzentrischen Hypertrophie und Dekompensation führt (Purcell et al. 2007; Kehat et al. 2011). Folglich scheint der ERK1/2-Signalweg vor allem für das anfängliche (adaptive) konzentrische Wachstum wichtig zu sein.

1.8 ANP

ANP ist ein 28-Aminosäuren-Peptid aus der Familie der natriuretischen Peptide und ist ein Marker der kardialen Hypertrophie (Klein et al. 1995; Fu et al. 2018). Das *NPPA*-Gen (natriuretisches-Peptid-Vorläufer-A-Gen) kodiert für PräproANP, welches durch mehrere Proteasen zu ProANP und schließlich zum aktiven ANP und inaktivem NT-ProANP (Amino-terminal-ProANP) gespalten wird. ANP wird hauptsächlich von den Herzvorhöfen gebildet und sezerniert, aber bei Herzinsuffizienz produzieren auch die Ventrikel einen erheblichen Anteil des Plasma-ANP. Die ANP-Synthese wird durch mechanische Dehnung der Kardiomyozyten oder durch hormonale Stimulation induziert. Zu den Effekten des ANPs zählen die Natriurese, die Diurese, eine Vasodilatation, eine Antiproliferation, eine Antihypertrophie und eine Antifibrose (Fu et al. 2018). Zudem hemmt ANP die Expression von ET-1 in Endothelzellen (Miyachi und Masaki 1999; Miyachi und Sakai 2019) und reguliert den blutdrucksteigernden Effekt von ET-1 negativ (Yuan et al. 2016). Dies kann als negative Rückkopplung verstanden werden, da ET-1 die ANP-Sekretion steigert. ANP hat also eine kardioprotektive Wirkung und wird bei Herzinsuffizienz als kompensatorischer Gegenspieler zu Katecholaminen, Endothelinen, Vasopressin und dem RAA-System ausgeschüttet. Die ANP-Wirkungen

werden durch die Bindung des Peptids an den NP-Rezeptor-A (natriuretisches-Peptid-Rezeptor-A) induziert, eine membranständige Guanylatcyclase, welche die Umwandlung von GTP in cGMP (3'-5'-zyklisches Guanosin-Monophosphat) katalysiert. Das cGMP vermittelt über die Aktivierung der PKG (Proteinkinase G) und der PDE (Phosphodiesterase) die weitere Signaltransduktion (Fu et al. 2018).

1.9 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist, näher zu ergründen, welche Rolle die mRNA-Modifikation m⁶A und ihre Demethylase FTO bei der Entwicklung einer Hypertrophie bis hin zu einer Herzinsuffizienz spielen. Um diese Frage zu beantworten, wurden die Auswirkungen eines FTO-*Knock-Downs* (deutsch: Herunterregulation) auf eine durch ET-1 induzierte Hypertrophie in hiPSC-CMs (= *human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes*, deutsch: aus humanen-induzierten-pluripotenten-Stammzellen-abgeleitete Kardiomyozyten) untersucht. Dabei sollte geklärt werden, ob ein FTO-*Knock-Down* und eine daraus resultierende m⁶A-Hypermethylierung von mRNAs die Entwicklung einer Hypertrophie bzw. einer Herzinsuffizienz eher begünstigt oder abschwächt.

Im Einzelnen wurden folgende Aspekte untersucht (Tabelle 1):

Tabelle 1: Fragestellungen der Arbeit

Fragestellung

Einfluss eines FTO-*Knock-Downs* auf eine durch ET-1 induzierte Hypertrophie

Einfluss eines FTO-*Knock-Downs* auf die durch ET-1 induzierte ANP-Synthese

Einfluss eines FTO-*Knock-Downs* auf die Menge des ERK1/2-Proteins

Einfluss eines FTO-*Knock-Downs* auf die m⁶A-Verteilung und -Menge

Einfluss einer ET-1-Stimulation auf die Menge des FTO-Proteins

2 Material und Methoden

2.1 Differenzierung von Kardiomyozyten aus Stammzellen

Die Kardiomyozyten wurden aus hiPSCs (= *human induced pluripotent stem cells*, deutsch: humane induziert pluripotente Stammzellen) ausdifferenziert. Es wurden die Stammzelllinien pCTRL1.1 (reprogrammiert durch ein episomales Plasmid) und WT-D2-1u (reprogrammiert durch einen viralen Vektor) verwendet. Diese Zelllinien wurden zuvor von der Arbeitsgruppe Streckfuß-Bömeke aus Keratinozyten reprogrammiert und charakterisiert (Streckfuß-Bömeke et al. 2013). Sowohl Stammzellen als auch Kardiomyozyten wurden auf mit Geltrex beschichteten Platten bei 5 % CO₂, 20 % O₂ und 37 °C in Kultur gehalten. Die Geltrex-Konzentration betrug 167 µg/ml. Dazu wurden 2 mg Geltrex in 12 ml DMEM (= *dulbecco's modified eagle medium*) gelöst. In DMEM gelöstes Geltrex wurde in jedes Well einer Platte bzw. auf den Boden einer T25-Flasche pipettiert. Die Platten oder Flaschen wurden für 30 Minuten bei 37 °C gelagert. In dieser Zeit hat sich eine Basalmembran-Matrixprotein-Beschichtung auf dem Boden der Platte/Flasche ausgebildet. Anschließend wurde das Medium aus den Wells der Platte/Flasche abgesaugt. Die Geltrex-Beschichtung blieb erhalten.

Die Stammzellen wurden auf 6-Well-Platten in E8-Medium kultiviert (2 ml/Well). Das Medium wurde täglich gewechselt. Hatten die Zellen 90 – 100 % Konfluenz erreicht, wurden sie verdünnt neu ausgesät. Dazu wurden sie einmal in Versene gewaschen (1 ml/Well) und anschließend drei Minuten lang bei 37 °C in Versene inkubiert (1 ml/Well). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Versene abgesaugt und die Zellen wurden mit E8-Medium (1 ml/Well) mit 0,1 % TZV-Zusatz (= Thiazovivin) von den Böden der Platte abgespült. Die in dem E8-Medium mit 0,1 % TZV gelösten Zellen wurden in gewünschter Verdünnung auf einer neuen Platte ausgesät (1:8 oder 1:10 für die fortlaufende Stammzellkultur, 1:12 oder 1:14 für Differenzierungen). Um sich vom Umsetzen zu erholen, wurden die Zellen für 24 Stunden in dem E8-Medium mit 0,1 % TVZ kultiviert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde wieder das E8-Medium ohne Zusatz als Nährmedium verwendet.

Für die Differenzierung wurde ein Protokoll verwendet, das von dem von Lian et al. beschriebenen Protokoll abgeleitet wurde (Lian et al. 2013). Für einen Überblick über das verwendete Differenzierungsprotokoll siehe Tabelle 2. Vor dem Start der Differenzierung

wurden die Stammzellen auf einer 12-Well-Platte ausgesät. Nachfolgend wurden sie in E8-Medium kultiviert (1 ml/Well), bis sie eine Konfluenz von 85 – 95 % erreicht hatten. Bis zum Beginn der Differenzierung wurde das Medium täglich gewechselt. Die Differenzierung wurde mit dem Glykogensynthase-Kinase-3-Inhibitor CHIR99021 gestartet (Tag 0). CHIR99021 wurde in Cardio-Differentiation-Medium gelöst. Die Konzentration betrug 4 $\mu\text{mol/L}$. Die Zellen wurden für 48 Stunden in dem CHIR99021-enthaltenden Medium kultiviert (2 ml/Well). Nach Ablauf dieser Zeit (Tag 2) wurden die Zellen für 48 Stunden in Cardio-Differentiation-Medium mit IWP2-Zusatz (= Inhibitor der Wnt-Produktion 2) kultiviert (2 ml/Well). Die IWP2-Konzentration betrug 5 $\mu\text{mol/L}$. An Tag 4 (96 Stunden nach dem Start der Differenzierung) erhielten die Zellen Cardio-Differentiation-Medium ohne Zusatz als Nährmedium (2 ml/Well). In diesem Medium wurden sie für 48 Stunden kultiviert. Darauffolgend (Tag 6 bis zum ersten Verdau) erhielten sie alle zwei Tage Cardio-Culture-Medium (2 ml/Well). Um Tag 10 herum begannen die Kardiomyozyten zu schlagen. Der erste Verdau wurde ab Tag 15 durchgeführt. Für den Verdau wurden die Zellen in Trypsin-EDTA (0,25 %) (= Ethylendiamintetraacetat) gewaschen (0,5 ml/Well) und anschließend für 5 bis 15 Minuten in diesem inkubiert (1 ml/Well). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Trypsin mit einer Pipette aufgenommen und die Zellen vom Boden der Platte abgespült. Der Trypsin-Verdau wurde durch Digestion-Medium abgestoppt (2 ml/Well). Die Suspension aus Zellen, Medium und Trypsin wurde für fünf Minuten bei 200 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen. Das zurückbleibende Zellpellet wurde in Digestion-Medium gelöst (1 ml/T25-Flasche). Im Rahmen dieses Verdau wurden die Zellen in T25-Flaschen umgesetzt. Nach dem Verdau wurden die Zellen für zwei bis drei Tage im Digestion-Medium kultiviert. Anschließend erfolgte die Selektion mithilfe von Selektionsmedium (4 ml/T25-Flasche), um eine möglichst reine Kardiomyozytenpopulation zu erzeugen und Zellen mit anderer Differenzierung absterben zu lassen. Die Dauer der Selektion betrug vier Tage. Nach zwei Tagen wurde das Selektionsmedium erneuert. Nach Abschluss der Selektion wurden die Kardiomyozyten bis mindestens Tag 60 in Cardio-Culture-Medium in Kultur gehalten (4 – 6 ml/T25-Flasche). Ein Mediumwechsel erfolgte alle drei bis vier Tage. Sobald die Kardiomyozyten ein Alter von mindestens 60 Tagen erreicht hatten, wurden sie für Experimente verwendet. Dazu wurden sie ein zweites Mal in Trypsin-EDTA verdaut und auf 6-Well-Platten oder 12-Well-Platten mit Deckgläschen umgesetzt. Der Verdau wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Zusätzlich wurden die Kardiomyozyten vor dem

Umsetzen gezählt (mit Hilfe einer Zählkammer), um eine Zellmenge von 600.000 pro Well einer 6-Well-Platte bzw. von 30.000 pro Well einer 12-Well-Platte zu erreichen. Die hiPSC-CMs wurden für zwei Tage im Digestion-Medium kultiviert. Danach wurden die Herzmuskelzellen bis zum Beginn des jeweiligen Experiments in Cardio-Culture-Medium kultiviert (2 – 2,5 ml/Well einer 6-Well-Platte, 1 – 1,5 ml/Well einer 12-Well-Platte). Ein Wechsel erfolgte alle drei bis vier Tage. Einen Tag vor Beginn des Experiments wurde das Medium ebenfalls ausgetauscht. Das jeweilige Experiment wurde gemäß dessen Protokoll durchgeführt. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Zellen am letzten Tag des Experiments geerntet. Für einen Überblick über die verwendeten Materialien siehe Tabellen 3 – 10.

Tabelle 2: Differenzierungsprotokoll

Tag	Schritt
x bis -1	Täglicher Mediumwechsel mit E8-Medium
0	CHIR99021 in Cardio-Differentiation-Medium
2	IWP2 in Cardio-Differentiation-Medium
4	Cardio-Differentiation-Medium
6+	Cardio-Culture-Medium alle zwei Tage
15+	Verdau 1
17+	Selektion
21+	Cardio-Culture-Medium alle drei bis vier Tage
60+	Verdau 2
62+	Cardio-Culture-Medium alle drei bis vier Tage

Tabelle 3: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Hersteller
pCTRL1.1	Arbeitsgruppe Streckfuß-Bömeke der Universitätsmedizin Göttingen (Streckfuss-Bömeke et al. 2013)
WT-D2-1u	Arbeitsgruppe Streckfuß-Bömeke der Universitätsmedizin Göttingen (Streckfuss-Bömeke et al. 2013)

Tabelle 4: Verwendete Kulturmedien

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
Cardio-Culture-Medium	500 ml RPMI Medium 1640 + GlutaMAX + HEPES	Thermo Fisher Scientific Inc.
	10 ml B-27 Supplement	Thermo Fisher Scientific Inc.
Cardio-Differentiation- Medium	500 ml RPMI Medium 1640 + GlutaMAX + HEPES	Thermo Fisher Scientific Inc.
	250 mg Albumin, human rekombinant	Merck KGaA
	100 mg L-Ascorbinsäure- 2-Phosphat	Merck KGaA

Medium	Zusammensetzung		Hersteller		
Digestion-Medium	80 ml	Cardio-Culture-Medium	Thermo	Fisher	Scientific Inc.
	20 ml	Fetal Bovine Serum	Thermo	Fisher	Scientific Inc.
	100 µl	Thiazovivin 2 µM (Thiazovivin in Dimethylsulfoxid)	Merck	KGaA	
Essential-8-Medium	500 ml	Essential 8 Basal Medium	Thermo	Fisher	Scientific Inc.
	10 ml	Essential 8 Supplement	Thermo	Fisher	Scientific Inc.
Selektionsmedium	500 ml	RPMI Medium 1640	Thermo	Fisher	Scientific Inc.
	250 mg	Albumin, human rekombinant	Merck	KGaA	
	100 mg	L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	Merck	KGaA	
	2 ml	Lactat-HEPES-Lösung im Verhältnis 1:6 (Natrium-DL-Lactat-Lösung, HEPES 1 M)	Merck	KGaA, Thermo Fisher Scientific Inc.	

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen Zellkultur

Chemikalie/Puffer/Lösung	Hersteller
CHIR99021 12 mM (CHIR99021 in Dimethylsulfoxid)	Merck KGaA
Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12 + GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific Inc.
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Thermo Fisher Scientific Inc.
Geltrex	Thermo Fisher Scientific Inc.
IWP2 5 mM (IWP2 in Dimethylsulfoxid)	Merck KGaA
Trypsin-EDTA 0,25 %	Thermo Fisher Scientific Inc.
Versene 1:5000	Thermo Fisher Scientific Inc.

Tabelle 6: Verwendete Materialien Zellkultur

Material	Hersteller
Pasteurpipetten	Thermo Fisher Scientific Inc.
Quadratische Deckgläschen	Thermo Fisher Scientific Inc.
Steriflip	Merck KGaA
Thoma Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
T25-Flasche	STARLAB International GmbH
Zellschaber	STARLAB International GmbH
6-Well-Platte	STARLAB International GmbH
12-Well-Platte	STARLAB International GmbH

Tabelle 7: Verwendete Geräte Zellkultur

Gerät	Hersteller
Absaugsystem	W. Krannich GmbH & Co. KG
Biofuge 13	Heraeus Holding GmbH
Eppendorf Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG
Feinwaage	Sartorius AG
Gasprofi 1 Bunsenbrenner	Thermo Fisher Scientific Inc.
Heracell VIOS 160i CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc.
Mikroskop Primovert	Carl Zeiss SMT GmbH
Sterilbank	W. Krannich GmbH & Co. KG

Tabelle 8: Verwendete allgemeine Chemikalien, Puffer, Lösungen

Chemikalie/Puffer/Lösung	Hersteller
Ethanol 100 %	Merck KGaA
nukleasefreies Wasser	Thermo Fisher Scientific Inc.
RNaseZero	Formedium Ltd

Tabelle 9: Verwendete allgemeine Materialien

Material	Hersteller
Eppendorf PCR Tubes	Eppendorf AG
Labortücher	Kimberly-Clark Worldwide Inc.
Präzisionstücher	Kimberly-Clark Worldwide Inc.
Quadratische Wägeschiffchen	Thermo Fisher Scientific Inc.
Vliestücher	Kimberly-Clark Worldwide Inc.
0,1 ml Combitips Advanced	Eppendorf AG
0,5 ml Combitips Advanced	Eppendorf AG
1,5 ml Eppendorf Tubes	Eppendorf AG
2 ml Eppendorf DNA LoBind Tube	Eppendorf AG
2 ml Eppendorf Tubes	Eppendorf AG
2 ml serologische Pipetten	SARSTEDT AG & Co. KG
2,5 ml Combitips Advanced	Eppendorf AG
5 ml serologische Pipetten	SARSTEDT AG & Co. KG
10 ml serologische Pipetten	SARSTEDT AG & Co. KG
10/20 µl TipOne Filterpipettenspitzen	STARLAB International GmbH
10/20 µl TipOne Pipettenspitzen	STARLAB International GmbH
15 ml Falcons	SARSTEDT AG & Co. KG
25 ml serologische Pipetten	SARSTEDT AG & Co. KG
50 ml Falcons	SARSTEDT AG & Co. KG
50 ml serologische Pipetten	SARSTEDT AG & Co. KG
100 µl TipOne Filterpipettenspitzen	STARLAB International GmbH
200 µl TipOne Pipettenspitzen	STARLAB International GmbH
1000 µl TipOne Filterpipettenspitzen	STARLAB International GmbH
1000 µl TipOne Pipettenspitzen	STARLAB International GmbH

Tabelle 10: Verwendete allgemeine Geräte

Gerät	Hersteller
Accu-jet pro Pipettierhelfer	Brand GmbH & Co. KG
Eppendorf Zentrifuge 5424 R	Eppendorf AG
Kipprollenmischer RS-TR 05	Phoenix Instrument GmbH
Multipette E3	Eppendorf AG
Tischzentrifuge	expondo GmbH
T100 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories Inc.
Vortexmischer VF2	IKA Werke GmbH & Co. KG
Waage BJ 610C	Precisa Gravimetrics AG
2,5 µl Eppendorf Research plus Pipette	Eppendorf AG
10 µl Eppendorf Research plus Pipette	Eppendorf AG
100 µl Eppendorf Research plus Pipette	Eppendorf AG
1000 µl Eppendorf Research plus Pipette	Eppendorf AG

Tabelle 11: Verwendete allgemeine Computerprogramme

Computerprogramm	Hersteller
GraphPad Prism	Graphpad Holdings LLC
Microsoft Excel	Microsoft Corporation

2.2 Ernte der Kardiomyozyten

Um die Zellen zu ernten, wurden diese in DPBS (= *dulbecco's phosphate buffered saline*) gewaschen (1 ml/Well) und anschließend mit einem Zellschaber von der Platte abgelöst. Die abgeschabten Kardiomyozyten wurden in DPBS suspensiert (1 ml/Well) und diese Suspension dann für eine Minute bei 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das verbleibende Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die eingefrorenen Kardiomyozyten bei -80 °C gelagert. Das gewonnene Zellpellet wurde verwendet, um daraus Protein oder RNA zu isolieren. Für einen Überblick über die verwendeten Materialien siehe Tabellen 5 – 10.

2.3 siRNA-Transfektion

Die mindestens 60 Tage alten Kardiomyozyten wurden in zwei Gruppen, eine Versuchs- und eine Kontrollgruppe, aufgeteilt. Die Zellen der Versuchsgruppe wurden mit einer FTO-siRNA (= *small interfering RNA*, deutsch: kleine interferierende RNA) (Zielsequenz: CAGGTCAGCGGTGGCAGTGTA) behandelt, um einen FTO-*Knock-Down* zu induzieren. Die Zellen der Kontrollgruppe erhielten hingegen eine Kontroll-siRNA (Negativ-Kontrolle/siKontrolle). Für die siRNA-Transfektion wurde das HiPerFect Transfektionsreagenz von QIAGEN N.V. verwendet. Zunächst wurde bei beiden Gruppen das Cardio-Culture-Medium in den 6-Well-Platten auf 2,3 ml pro Well und in den 12-Well-Platten auf 1,1 ml pro Well aufgefüllt. Die Transfektion vorbereitend wurden pro zu versorgendem Plattenwell 0,6 µl (6-Well-Platte) oder 0,3 µl (12-Well-Platte) siRNA 20 µM (FTO oder Kontrolle) in 100 µl Cardio-Culture-Medium gelöst. Anschließend wurden pro zu versorgendem Plattenwell 12 µl (6-Well-Platte) oder 6 µl (12-Well-Platte) Transfektionsreagenz hinzugefügt und alles mit einem Vortexmischer vermischt. Darauffolgend wurden die Transfektionsgemische (ein FTO-siRNA-Gemisch und ein Kontroll-siRNA-Gemisch) für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bildung der Transfektionskomplexe zu ermöglichen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 100 µl des siRNA-Transfektionsgemisches (FTO-siRNA-Gemisch oder Kontroll-siRNA-Gemisch) tröpfchenweise in jedes Plattenwell pipettiert. Danach wurden die Platten leicht geschaukelt, um die Transfektionskomplexe zu verteilen. Die finale Konzentration der jeweiligen siRNA im Medium betrug somit 5 nM. Die Zellen wurden für 48 Stunden in dem siRNA-enthaltenden Medium unter Standardbedingungen kultiviert (5 % CO₂, 20 % O₂ und 37 °C). Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Kardiomyozyten geerntet (s. Abschnitt 2.2). Für einen Überblick über die siRNA-Transfektion siehe Tabelle 49. Für einen Überblick über die verwendeten Materialien siehe Tabellen 4 – 10 und 12 – 13.

Tabelle 12: Verwendete siRNAs

siRNA	Hersteller
AllStars Negative Control siRNA	QIAGEN N.V.
Hs_FTO_5	QIAGEN N.V.

Tabelle 13: Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen siRNA-Transfektion

Chemikalie/Puffer/Lösung	Hersteller
HiPerFect Transfection Reagent	QIAGEN N.V.

2.4 Endothelin-1-Behandlung

Die mindestens 60 Tage alten hiPSC-CMs wurden in zwei Gruppen, eine Versuchs- und eine Kontrollgruppe, aufgeteilt. Die Zellen der Versuchsgruppe wurden mit Endothelin-1 behandelt, um sie unter Stress zu setzen und eine Hypertrophie zu induzieren. Die Zellen der Kontrollgruppe wurden lediglich einem Mediumwechsel unterzogen. Dazu wurde bei beiden Gruppen zunächst das Cardio-Culture-Medium abgesaugt. Anschließend erhielten die Kardiomyozyten der Versuchsgruppe pro Plattenwell 2 ml Cardio-Culture-Medium, mit darin gelöstem Endothelin-1. Die ET-1-Konzentration betrug 3 nM (3 µl ET-1 1 µM pro ml Cardio-Culture-Medium). Die Zellen der Kontrollgruppe erhielten stattdessen 2 ml reines Cardio-Culture-Medium. Die Kardiomyozyten wurden für 48 Stunden in dem Medium (mit oder ohne ET-1) unter Standardbedingungen kultiviert (5 % CO₂, 20 % O₂ und 37 °C). Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen geerntet (s. Abschnitt 2.2). Für einen Überblick über die Endothelin-1-Behandlung siehe Tabelle 50. Für einen Überblick über die verwendeten Materialien siehe Tabellen 4 – 10 und 14.

Tabelle 14: Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen Endothelin-1-Behandlung

Chemikalie/Puffer/Lösung	Hersteller
Endothelin-1	Merck KGaA

2.5 Kombination der siRNA-Transfektion mit der Endothelin-1-Behandlung – 96-Stunden-Protokoll

Die mindestens 60 Tage alten Kardiomyozyten wurden in drei Gruppen, eine FTO-*Knock-Down*-Gruppe, eine FTO-*Knock-Down* + ET-1-Gruppe und eine Kontrollgruppe, aufgeteilt. An Tag 0 wurde die siRNA-Transfektion, wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, durchgeführt. Die Zellen der FTO-*Knock-Down*- und der FTO-*Knock-Down* + ET-1-Gruppe erhielten eine FTO-siRNA, die Zellen der Kontrollgruppe eine Kontroll-siRNA. Die Zellen wurden für 48 Stunden in dem siRNA-enthaltenden Medium unter

Standardbedingungen kultiviert (5 % CO₂, 20 % O₂ und 37 °C). Nach Ablauf dieser 48 Stunden (Tag 2) wurden die Kardiomyozyten der FTO-*Knock-Down* + ET-1-Gruppe mit ET-1 behandelt (s. Abschnitt 2.4). Die Kardiomyozyten der FTO-*Knock-Down*-Gruppe und die Kardiomyozyten der Kontrollgruppe wurden einem Mediumwechsel unterzogen (s. Abschnitt 2.4). Anschließend wurden die Zellen für 48 Stunden in dem Medium (mit oder ohne ET-1) unter Standardbedingungen kultiviert (5 % CO₂, 20 % O₂ und 37 °C). Nach Ablauf dieser Zeit (96 Stunden insgesamt, Tag 4) wurden die hiPSC-CMs schließlich geerntet (s. Abschnitt 2.2). Für einen Überblick über das 96-Stunden-Protokoll siehe Tabelle 51. Für einen Überblick über die verwendeten Materialien siehe Tabellen 4 – 10 und 12 – 14.

2.6 Kombination der siRNA-Transfektion mit der Endothelin-1-Behandlung – 72-Stunden-Protokoll

Die mindestens 60 Tage alten hiPSC-CMs wurden in vier Gruppen, eine FTO-*Knock-Down*-Gruppe, eine ET-1-Gruppe, eine FTO-*Knock-Down* + ET-1-Gruppe und eine Kontrollgruppe, aufgeteilt. An Tag 0 wurde die siRNA-Transfektion, wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, durchgeführt. Die Zellen der FTO-*Knock-Down*-Gruppe und die Zellen der FTO-*Knock-Down* + ET-1-Gruppe erhielten eine FTO-siRNA, die Zellen der ET-1-Gruppe und die Zellen der Kontrollgruppe eine Kontroll-siRNA. Die Kardiomyozyten wurden für 24 Stunden in dem siRNA-enthaltenden Medium unter Standardbedingungen kultiviert (5 % CO₂, 20 % O₂ und 37 °C). Nach Ablauf dieser 24 Stunden (Tag 1) wurde das Cardio-Culture-Medium ausgetauscht und die siRNA-Transfektion erneut durchgeführt (s. Abschnitt 2.3). Die Kardiomyozyten wurden wieder für 24 Stunden in dem siRNA-enthaltenden Medium unter Standardbedingungen kultiviert (5 % CO₂, 20 % O₂ und 37 °C). Nach Ablauf dieser Zeit (48 Stunden insgesamt, Tag 2) wurden die Herzmuskelzellen der ET-1-Gruppe und die Herzmuskelzellen der FTO-*Knock-Down* + ET-1-Gruppe mit ET-1 behandelt (s. Abschnitt 2.4). Die Kardiomyozyten der FTO-*Knock-Down*-Gruppe und die Kardiomyozyten der Kontrollgruppe wurden einem Mediumwechsel unterzogen (s. Abschnitt 2.4). Die hiPSC-CMs wurden für 48 Stunden in dem Medium (mit oder ohne ET-1) unter Standardbedingungen kultiviert (5 % CO₂, 20 % O₂ und 37 °C). Nach Ablauf dieser Zeit (72 Stunden nach der zweiten siRNA-Transfektion, 96 Stunden insgesamt, Tag 4) wurden die Kardiomyozyten schließlich geerntet (s. Abschnitt 2.2) oder fixiert (s. Abschnitt 2.14). Für einen Überblick über das 72-Stunden-Protokoll siehe Tabelle 52. Für einen Überblick über die verwendeten

Materialien siehe Tabellen 4 – 10 und 12 – 14.

2.7 Protein-Isolation

Für die Protein-Isolation wurden die gefrorenen Zellpellets in RIPA-Puffer (30 µl RIPA-Puffer pro 600.000 Zellen) gelöst. Anschließend wurden die Proben für zehn Minuten auf Eis gelagert und dabei alle zwei Minuten mit Hilfe eines Vortexmischers gemischt. Darauffolgend wurden die Proben bei einer Raumtemperatur von 4 °C für eine halbe bis drei Stunde(n) in einem Overhead-Roller gedreht (invertiert und wieder vertiert). Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Proben bei 4 °C und 16.000 g für 15 Minuten zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurden die Überstände in neue Eppendorf Tubes überführt. Die Sedimente wurden verworfen. Die isolierten Protein-Proben wurden bis zu ihrer Weiterverwendung bei -80 °C gelagert. Für einen Überblick über die verwendeten Materialien siehe Tabellen 8 – 10 und 15 – 16.

Tabelle 15: Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen Protein-Isolation

Chemikalie/Puffer/Lösung	Hersteller
RIPA-Puffer (Pierce RIPA Buffer, Thermo Fisher Scientific Inc., F. Phosphatase-Inhibitor Tabletten, Hoffmann-La Roche AG Protease-Inhibitor Tabletten)	

Tabelle 16: Verwendete Geräte Protein-Isolation

Gerät	Hersteller
Overhead-Roller	Pro-Consult A/S

2.8 Bestimmung der Protein-Konzentration

Für die Konzentrationsbestimmung wurde aus jeder Protein-Probe eine 1:10 verdünnte Probe abgeschöpft. Die Bestimmung der Protein-Konzentration erfolgte mit Hilfe des BCA Protein Assays von Thermo Fisher Scientific Incorporated. Je 25 µl der Protein-Standards A bis I (Albumin-Konzentrationen: 2000 µg/mL, 1500 µg/mL, 1000 µg/mL, 750 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 25 µg/mL, 0 µg/mL) und der Proben in Doppelbestimmung wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurde in

jedes Well 200 µl der BCA-Reagenzmischung (Verhältnis Reagenz A zu Reagenz B 50:1) pipettiert. Darauffolgend wurde die 96-Well-Platte für eine halbe Stunde in einen 37 °C warmen Inkubator gestellt. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Messung der Absorption bei 562 nm in einem 96-Well-Platten-Photometer und die Errechnung der Protein-Konzentrationen durch das KC4-Programm von Agilent Technologies Incorporated. In Excel wurde eine Ausgleichsgerade für die gemessenen Konzentrationen der Protein-Standards erstellt und mit Hilfe dieser erfolgte die korrigierte Errechnung der Proben-Konzentrationen. Zuletzt erfolgte die Hochrechnung auf die Protein-Konzentrationen der unverdünnten Original-Proben. Für einen Überblick über die verwendeten Materialien siehe Tabellen 8 – 11 und 17 – 20.

Tabelle 17: Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen Protein-Konzentrationsbestimmung

Chemikalie/Puffer/Lösung	Hersteller
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.

Tabelle 18: Verwendete Materialien Protein-Konzentrationsbestimmung

Material	Hersteller
96-Well-Platte	STARLAB International GmbH

Tabelle 19: Verwendete Geräte Protein-Konzentrationsbestimmung

Gerät	Hersteller
96-Well-Platten-Photometer	Agilent Technologies Inc.

Tabelle 20: Verwendete Computerprogramme Protein-Konzentrationsbestimmung

Computerprogramm	Hersteller
KC4 Software	Agilent Technologies Inc.

2.9 SDS-PAGE und Western Blot

Für die SDS-PAGE (= *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, deutsch: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) wurde eine Masse von

8 – 20 µg und ein Volumen von 15 µl oder 22,5 µl pro Probe gewählt (je Versuch wurde für jede Probe die gleiche Masse und das gleiche Volumen gewählt). Um die gewünschte Masse und das gewünschte Volumen zu erreichen, wurde je nach Ausgangskonzentration ein entsprechendes Volumen jeder Probe mit einem entsprechenden Volumen Wasser gemischt. Anschließend wurden die Proben mit einem Mix aus 2 M DTT (= Dithiothreitol) und 4x Laemmli Sample Buffer (2 M DTT:4x Laemmli Sample Buffer 1:9) im Verhältnis 3:1 gemischt. Darauffolgend wurden die Proben für fünf Minuten bei 98 °C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Nach der Denaturierung wurden die Proben in Eis gekühlt und schließlich in die Kammern eines 10 %-Polyacrylamid-Gels pipettiert. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker in eine Kammer des Gels pipettiert, um später eine Größenbestimmung der Proteine vornehmen zu können. Die Gele wurden in einer Lauf-Kammer, die mit Lauf-Puffer gefüllt wurde, platziert. Anschließend wurde die Gelelektrophorese für 35 bis 45 Minuten bei 200 V durchgeführt. Nach der erfolgreichen Auftrennung der Proteine wurden die Gele eine Minute lang mit UV-Licht aktiviert.

Für den Transfer der Proteine auf eine Zellulosenitrat-Membran wurde das Trans-Blot Turbo Transfer System von Bio-Rad Laboratories Incorporated genutzt. Dazu wurde in einer Transfer-Kassette ein Sandwich aus Filterpapier, der Membran, dem Gel und wieder Filterpapier gebaut. Zuvor wurden die Bestandteile des Sandwichs in Transfer-Puffer befeuchtet. Der Transfer wurde für fünf (ein Gel pro Kassette) oder sieben Minuten (zwei Gele pro Kassette) bei einem konstanten Strom von 2,5 A durchgeführt. Im Anschluss wurden Bilder der Membranen mit dem ChemiDoc XRS+ System von Bio-Rad Laboratories Incorporated erstellt. Nachfolgend wurden die Membranen eine Stunde lang bei Raumtemperatur in 5 %-tiger Milch geblockt, um eine unspezifische Antikörper-Bindung abzuwenden. Nach dem Blocken der Membranen wurden diese über Nacht bei 4 °C in primärem Antikörper (verdünnt in 1 %-tiger Milch, s. Tabelle 21) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal für fünf Minuten in TBST (= *tris buffered saline* mit 0,1 % Tween) gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Nach dem Waschen wurden die Membranen eine Stunde lang bei Raumtemperatur in sekundärem Antikörper (1:10.000 verdünnt in 1 %-tiger Milch) inkubiert. Daraufhin wurden die Membranen erneut dreimal für fünf Minuten in TBST gewaschen. Um die Chemolumineszenz-Reaktion auszulösen, wurden die Membranen für fünf Minuten in

Luminol (verdünnt in Peroxid-Puffer im Verhältnis 1:1) inkubiert. Die Chemolumineszenz wurde mit dem ChemiDoc XRS+ System gemessen.

Die Rohdaten wurden mit Hilfe der Image Lab Software von Bio-Rad Laboratories Incorporated erstellt und in eine Excel-Tabelle übertragen. Dort wurden die Daten auf das Gesamtprotein normalisiert und auf den Mittelwert der Kontrollgruppe relativiert. Schließlich wurden die Daten mit GraphPad Prism statistisch ausgewertet und entweder ein ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur oder eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Welch-Korrektur und nachfolgendem Dunnett-T3-mehrfacher-Vergleich-Test durchgeführt, um zu überprüfen, ob ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Proteinspiegeln besteht. Für einen Überblick über die verwendeten Materialien siehe Tabellen 8 – 11 und 22 – 29.

Tabelle 21: Primäre Antikörper Western Blot mit Verdünnung und sekundärem Antikörper

Primärer Antikörper	Verdünnung	Sekundärer Antikörper
ANP	1:1000	Kaninchen
FTO	1:1000	Maus
Total-ERK1/2	1:1000	Kaninchen

Tabelle 22: Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen SDS-PAGE

Chemikalie/Puffer/Lösung	Hersteller
Ammoniumperoxodisulfat	Merck KGaA
Dithiothreitol	Merck KGaA
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	Merck KGaA
Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standards	Bio-Rad Laboratories Inc.
TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit	Bio-Rad Laboratories Inc.
4x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad Laboratories Inc.
10x Tris/Glycine/SDS Running Buffer	Bio-Rad Laboratories Inc.

Tabelle 23: Verwendete Materialien SDS-PAGE

Material	Hersteller
Mini-PROTEAN Combs 10-well (1,5 mm, 66 µl)	Bio-Rad Laboratories Inc.
Mini-PROTEAN Combs 15-well (1,5 mm, 40 µl)	Bio-Rad Laboratories Inc.
Mini-PROTEAN Short Plates	Bio-Rad Laboratories Inc.
Mini-PROTEAN Spacer Plates with 1,5 mm Integrated Spacers	Bio-Rad Laboratories Inc.
Mini-PROTEAN Tetra Cell Casting Stand with Clamp Kit for Single Core	Bio-Rad Laboratories Inc.
10 µl TipOne Pipettenspitzen zur Gel-Beladung	STARLAB International GmbH
200 µl TipOne Pipettenspitzen zur Gel-Beladung	STARLAB International GmbH

Tabelle 24: Verwendete Geräte SDS-PAGE

Gerät	Hersteller
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories Inc.
PowerPac HC High-Current Power Supply	Bio-Rad Laboratories Inc.

Tabelle 25: Verwendete Antikörper Western Blot

Antikörper	Hersteller
ANP-Antikörper	Abcam plc.
Anti-Mouse-IgG-Antikörper	Cell Signaling Technology
Anti-Rabbit-IgG-Antikörper	General Electric Company
FTO-Antikörper	Bio-Techne Corporation
Total-ERK1/2-Antikörper	Cell Signaling Technology

Tabelle 26: Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen Western Blot

Chemikalie/Puffer/Lösung	Hersteller
Clarity Max Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories Inc.
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG
Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc.
10x Tris Buffered Saline	Bio-Rad Laboratories Inc.
10x Tris/Glycine Transfer Buffer	Bio-Rad Laboratories Inc.
10 % Tween 20	Bio-Rad Laboratories Inc.

Tabelle 27: Verwendete Materialien Western Blot

Material	Hersteller
Transparente Entwicklertaschen	Biozym Scientific GmbH
Trans-Blot Turbo RTA Mini Nitrocellulose Transfer Kit	Bio-Rad Laboratories Inc.

Tabelle 28: Verwendete Geräte Western Blot

Gerät	Hersteller
ChemiDoc XRS+ System	Bio-Rad Laboratories Inc.
Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories Inc.

Tabelle 29: Verwendete Computerprogramme Western Blot

Computerprogramm	Hersteller
Image Lab	Bio-Rad Laboratories Inc.

2.10 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurde das Direct-zol RNA MicroPrep Kit von der Zymo Research Corporation verwendet. Vorbereitend wurden alle Arbeitsflächen und Pipetten von RNasen gereinigt. Die Zellpellets wurden jeweils in 300 µl TRI-Reagenz gelöst. Anschließend wurden jeweils 300 µl Ethanol 100 % hinzugefügt und die Proben mit Hilfe eines Vortexmischers gemischt. Darauffolgend wurden die Proben in Zymo-Spin IC Säulen, in Sammeltubes steckend, überführt und für eine halbe Minute bei 13.000 g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurden die Sammeltubes mit den Durchflüssen verworfen und die Säulen in neue Sammeltubes gesteckt. Im Anschluss wurden jeweils 400 µl RNA PreWash in die Säulen pipettiert und die Proben erneut für eine halbe Minute bei 13.000 g zentrifugiert. Die Durchflüsse wurden verworfen. Danach wurden erneut jeweils 400 µl RNA PreWash in die Säulen pipettiert und die Proben für eine halbe Minute bei 13.000 g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurden die Durchflüsse verworfen. Daraufhin wurden 700 µl RNA-Waschpuffer in die Säulen pipettiert und die Proben für zwei Minuten bei 13.000 g zentrifugiert. Die Sammeltubes mit den Durchflüssen wurden verworfen. Anschließend wurden jeweils 15 µl RNase-freies Wasser in die Säulen pipettiert und diese auf RNase-freie Tubes gesteckt. In einem letzten Schritt wurden die Proben für eine Minute bei 16.000 g zentrifugiert. Danach wurden die Säulen verworfen und die Tubes mit der isolierten RNA aufbewahrt. Für einen Überblick über die RNA-Isolation siehe Tabelle 30. Für einen Überblick über die verwendeten Materialien siehe Tabellen 8 – 10 und 31.

Tabelle 30: Schritte der RNA-Isolation**Schritt**

Hinzufügen des TRI-Reagenzes

Hinzufügen von Ethanol 100 %

Zentrifugieren

Durchfluss verwerfen

Hinzufügen von RNA PreWash

Zentrifugieren

Durchfluss verwerfen

Hinzufügen von RNA PreWash

Zentrifugieren

Durchfluss verwerfen

Hinzufügen von RNA-Waschpuffer

Zentrifugieren

Durchfluss verwerfen

Hinzufügen von RNase-freiem Wasser

Zentrifugieren

Säulen verwerfen, Tubes aufbewahren

Tabelle 31: Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen RNA-Isolation**Chemikalie/Puffer/Lösung****Hersteller**

Direct-zol RNA MicroPrep Kit

Zymo Research Corporation

2.11 RNA-Reinigung und -Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Reinigung wurde direkt nach der RNA-Isolation mit Hilfe des RNA Clean & Concentrator-5 Sets von der Zymo Research Corporation durchgeführt. Zunächst erfolgte eine DNase-Behandlung der isolierten RNA. Dafür wurden die Proben mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 40 µl aufgestockt, mit 5 µl DNase I sowie 5 µl DNA-Verdauerpuffer gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit jeweils 100 µl RNA-Bindungspuffer und danach mit jeweils 150 µl Ethanol 100 % gemischt. Darauffolgend wurden die Proben in Zymo-Spin IC Säulen, in Sammel tubes steckend, überführt und für eine Minute bei 11.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Danach wurden jeweils 400 µl RNA Prep Puffer in die Säulen pipettiert und diese für eine halbe Minute bei 11.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und jeweils 700 µl RNA-Waschpuffer in die Säulen pipettiert. Im Anschluss erfolgte ein erneutes Zentrifugieren der Proben für eine halbe Minute bei 11.000 g. Nach dem Zentrifugieren wurde der Durchfluss verworfen und jeweils 400 µl RNA-Waschpuffer in die Säulen pipettiert. Daraufhin wurden die Proben für zwei Minuten bei 11.000 g zentrifugiert. Danach wurden die Sammel tubes mit den Durchflüssen verworfen und die Säulen auf RNase-freie Tubes gesteckt. Anschließend wurden jeweils 15 µl RNase-freies Wasser in die Säulen pipettiert und diese für eine Minute bei 16.000 g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurden die Säulen verworfen. Die Tubes mit der isolierten und gereinigten RNA wurden aufbewahrt und in Eis gekühlt. Zuletzt wurden die RNA-Konzentrationen der Proben mit Hilfe des NanoPhotometers von Implen Incorporated bestimmt. Bis zu ihrer Weiterverwendung wurden die Proben bei -80 °C gelagert. Für einen Überblick über die RNA-Reinigung siehe Tabelle 32. Für einen Überblick über die verwendeten Materialien siehe Tabellen 8 – 10 und 33 – 34.

Tabelle 32: Schritte der RNA-Reinigung

Schritt
DNase-Behandlung
Hinzufügen von RNA-Bindungspuffer
Hinzufügen von Ethanol 100 %
Zentrifugieren
Durchfluss verwerfen
Hinzufügen von RNA Prep Puffer
Zentrifugieren
Durchfluss verwerfen
Hinzufügen von RNA-Waschpuffer
Zentrifugieren
Durchfluss verwerfen
Hinzufügen von RNA-Waschpuffer
Zentrifugieren
Durchfluss verwerfen
Hinzufügen von RNase-freiem Wasser
Zentrifugieren
Säulen verwerfen, Tubes aufbewahren

Tabelle 33: Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen RNA-Reinigung

Chemikalie/Puffer/Lösung	Hersteller
RNA Clean & Concentrator-5	Zymo Research Corporation

Tabelle 34: Verwendete Geräte RNA-Konzentrationsbestimmung

Gerät	Hersteller
NanoPhotometer N60	Implen Inc.

2.12 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese (= *complementary DNA*, deutsch: komplementäre DNA) wurde das iScript cDNA Synthesis Kit von Bio-Rad Laboratories Incorporated verwendet. Es wurden pro Probe 500 ng RNA in cDNA umgeschrieben. Um die gewünschte Masse von 500 ng zu erreichen, wurde je nach Ausgangskonzentration ein unterschiedliches Volumen verwendet. Anschließend wurde das Volumen jeder Probe mit nukleasefreiem Wasser auf 15 µl aufgestockt. Jede Probe wurde mit 4 µl Reaktions-Mix und 1 µl Reverse-Transkriptase gemischt. Darauffolgend wurden die Proben in einen Thermal-Cycler gestellt, in welchem die verschiedenen Schritte der reversen Transkription abliefen (s. Tabelle 35). Nach Abschluss der reversen Transkription wurden die Proben in Eis gekühlt und mit 20 µl Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 40 µl aufgestockt, um eine cDNA-Konzentration von 12,5 ng/µl zu erreichen. Bis zu ihrer Weiterverwendung wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Für einen Überblick über die verwendeten Materialien siehe Tabellen 8 – 11 und 36.

Tabelle 35: Schritte der reversen Transkription

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (Minuten)
Priming	25	5
Reverse Transkription	46	20
Reverse-Transkriptase-Inaktivierung	95	1

Tabelle 36: Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen cDNA-Synthese

Chemikalie/Puffer/Lösung	Hersteller
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories Inc.

2.13 qPCR

Die Echtzeit-qPCR (= *quantitative polymerase chain reaction*, deutsch: quantitative Polymerase-Kettenreaktion) wurde mit Hilfe des SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix von Bio-Rad Laboratories Incorporated durchgeführt. Zunächst wurde 1 µl cDNA (12,5 ng) jeder Probe mit jeweils 10 µl Supermix, 8,4 µl Wasser und 0,6 µl Primer-Mix (6 pmol Vorwärtsprimer und 6 pmol Rückwärtsprimer) gemischt. Die

Reaktionsgemische wurden in die Wells einer qPCR-Platte pipettiert. Als Negativ-Kontrolle wurde Wasser (statt cDNA) verwendet. S18 wurde als Ladekontrolle verwendet (verwendete Primer s. Tabelle 38). Die qPCR-Platten wurden mit einer Klebefolie abgedichtet und anschließend für eine Minute bei 1.000 g zentrifugiert. Danach wurde die Echtzeit-qPCR im CFX Connect Real-Time PCR Detection System von Bio-Rad Laboratories Incorporated durchgeführt (qPCR-Protokoll s. Tabelle 37).

Nach Abschluss der qPCR wurden die Rohdaten mit Hilfe des CFX Maestro Programms von Bio-Rad Laboratories Incorporated erstellt und in eine Excel-Tabelle übertragen. Dort wurden die Daten mit Hilfe der ddCT-Methode (Livak und Schmittgen 2001) auf die S18-mRNA normalisiert und auf den Mittelwert der Kontrollgruppe relativiert. Schließlich wurden die Daten mit GraphPad Prism statistisch ausgewertet und entweder ein ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur oder eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Welch-Korrektur und nachfolgendem Dunnett-T3-mehrfacher-Vergleich-Test durchgeführt, um zu überprüfen, ob ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den mRNA-Spiegeln besteht. Für einen Überblick über die verwendeten Materialien siehe Tabellen 8 – 11 und 38 – 42.

Tabelle 37: qPCR-Protokoll

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (Sekunden)	Anzahl der Zyklen
Polymerase-Aktivierung + erste DNA-Denaturierung	95	180	1
DNA-Denaturierung	95	10	45
Primerhybridisierung + Elongation	60	30	45
Schmelzkurven-Analyse	55-95	6 pro 0,5 °C-Temperaturschritt	1

Tabelle 38: Verwendete Primer qPCR

Primer	Sequenz	Hersteller
FTOhuman_qPCR_F2	GGAGGGTGTGACAAATGCTG	Eurofins Scientific SE
FTOhuman_qPCR_R2	GCAGGTAATGTT?GGGCAAT	Eurofins Scientific SE
S18 Human F	ACCCGTTGAACCCCATTCGTGA	Eurofins Scientific SE
S 18 Human R	GCCTCACTAAACCATCCAATCGG	Eurofins Scientific SE

Tabelle 39: Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen qPCR

SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories Inc.
---	---------------------------

Tabelle 40: Verwendete Materialien qPCR

Material	Hersteller
Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film	Bio-Rad Laboratories Inc.
96-Well-PCR-Platten	Bio-Rad Laboratories Inc.

Tabelle 41: Verwendete Geräte qPCR

Gerät	Hersteller
CFX Connect Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories Inc.

Tabelle 42: Verwendete Computerprogramme qPCR

Computerprogramm	Hersteller
CFX Maestro	Bio-Rad Laboratories Inc.

2.14 Immunfluoreszenz-Färbung und Zellgrößenmessung

Die für die Immunfluoreszenz-Färbung verwendeten Zellen wurden zuvor auf Deckgläschen in 12-Well-Platten kultiviert (30.000 Zellen pro Well). Vorbereitend wurden die Kardiomyozyten auf den Deckgläschen fixiert. Dazu wurde das Cardio-Culture-Medium abgesaugt und 1 ml DPBS in jedes Well pipettiert. Kurz darauf wurde das DPBS wieder abgesaugt und 1 ml Roti-Histofix 4 % der Carl Roth GmbH + Co. KG in jedes Well pipettiert. Die Zellen wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Histofix inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Histofix abgesaugt und 1 ml DPBS in jedes Well pipettiert (1. Waschung). Anschließend wurde das DPBS wieder abgesaugt und erneut 1 ml DPBS in jedes Well pipettiert (2. Waschung). Daraufhin wurde das DPBS wieder abgesaugt und 0,5 ml BCS 1 % (= *bovine calf serum*, deutsch: bovines Kälber-Serum) in jedes Well pipettiert. Zuletzt wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und bis zu ihrer Weiterverwendung bei 4 °C gelagert.

Für die Immunfluoreszenz-Färbung wurden die Deckgläschen mit den darauf fixierten Kardiomyozyten aus den 12-Well-Platten entfernt und dreimal in DPBS gewaschen. Im Anschluss wurden 100 µl des primären Antikörpers, verdünnt in BCS 1 % mit 0,1 % Triton X-100 (s. Tabelle 43), auf jedes Deckgläschen pipettiert. Die Deckgläschen wurden eine Nacht lang bei 4 °C in einer Feuchtkammer im primären Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen erneut dreimal in DPBS gewaschen. Danach wurden 100 µl des sekundären Antikörpers, 1:1000 verdünnt in BCS 1 % mit 0,1 % Triton X-100, auf jedes Deckgläschen pipettiert. Die Deckgläschen wurden eine Stunde lang bei 37 °C in einer Feuchtkammer im sekundären Antikörper inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Deckgläschen dreimal in DPBS und einmal in Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen mit ProLong Gold Antifade Mountant (mit DAPI) von Thermo Fisher Scientific Incorporated auf Objektträgern fixiert. Die Objektträger mit den Deckgläschen wurden bis zu ihrer Weiterverwendung (mindestens eine Nacht lang) bei 4 °C zum Trocknen gelagert. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1 von der Carl Zeiss SMT GmbH mikroskopiert und Bilder der Kardiomyozyten mit dem AxioVision Programm der Carl Zeiss SMT GmbH erstellt. Die Bilder wurden bei 400-facher Vergrößerung im FITC-Kanal (488 nm) und im DAPI-Kanal (358 nm) aufgenommen, um das jeweilige Ziel-Protein und die Zellkerne sichtbar zu machen.

Im Fall der α -Actinin-Färbung wurde anschließend noch die Größe der Zelloberfläche mit ImageJ bestimmt. Dazu wurden die Bilder in 8-Bit-Bilder umgewandelt und die Distanz eines Pixels auf 0,1614 μm festgelegt. Der Kontrast wurde um 0,3 % erhöht und die Bilder wurden zu Schwarz-Weiß-Bildern mit dunklem Hintergrund konvertiert. Zudem wurde Li's Algorithmus für den minimalen Kreuzentropie-Schwellenwert angewendet (Li und Tam 1998). Löcher im Zellbereich wurden aufgefüllt. Dann wurden die Zelloberflächen mit dem ROI Manager ausgemessen. Die Rohdaten wurden in eine Excel-Tabelle übertragen und auf den Mittelwert der Kontrollgruppe relativiert. Danach wurden die Daten mit GraphPad Prism statistisch ausgewertet. Ausreißer-Werte wurden herausgerechnet. Zuletzt wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Welch-Korrektur und nachfolgendem Games-Howell-mehrfacher-Vergleich-Test durchgeführt, um zu überprüfen, ob ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Zellgrößen besteht. Für einen Überblick über die verwendeten Materialien siehe Tabellen 8 – 11 und 44 – 48.

Tabelle 43: Primäre Antikörper Immunfluoreszenz-Färbung mit Verdünnung und sekundärem Antikörper

Primärer Antikörper	Verdünnung	Sekundärer Antikörper
α -Actinin	1:1000	Alexa Fluor 488 Anti-Maus
FTO	1:500	Alexa Fluor 488 Anti-Maus
m ⁶ A	1:1000	Alexa Fluor 488 Anti-Kaninchen

Tabelle 44: Verwendete Antikörper Immunfluoreszenz-Färbung

Antikörper	Hersteller
α -Actinin-Antikörper	Merck KGaA
Alexa Fluor 488 Anti-mouse-IgG-Antikörper	Thermo Fisher Scientific Inc.
Alexa Fluor 488 Anti-rabbit-IgG-Antikörper	Thermo Fisher Scientific Inc.
m ⁶ A-Antikörper	Synaptic Systems GmbH

Tabelle 45: Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen Immunfluoreszenz-Färbung

Chemikalie/Puffer/Lösung	Hersteller
Bovine calf serum	Thermo Fisher Scientific Inc.
ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI	Thermo Fisher Scientific Inc.
Roti-Histofix 4 %	Carl Roth GmbH + Co. KG
Triton X-100	Thermo Fisher Scientific Inc.

Tabelle 46: Verwendete Materialien Immunfluoreszenz-Färbung

Material	Hersteller
Objektträger mit Beschriftungsfeld	Thermo Fisher Scientific Inc.
Parafilm	Merck KGaA
Petrischale	Thermo Fisher Scientific Inc.
Runde Deckgläschen	Thermo Fisher Scientific Inc.

Tabelle 47: Verwendete Geräte Immunfluoreszenz-Färbung

Gerät	Hersteller
Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1	Carl Zeiss SMT GmbH

Tabelle 48: Verwendete Computerprogramme Immunfluoreszenz-Färbung und Zellgrößenmessung

Computerprogramm	Hersteller
AxioVision	Carl Zeiss SMT GmbH
ImageJ	National Institutes of Health

3 Ergebnisse

Alle Versuche wurden an mindestens 60 Tage alten hiPSC-CMs durchgeführt, die zuvor aus hiPSCs ausdifferenziert wurden (s. Abschnitt 2.1). Zum Teil wurden die Versuche in zwei unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt, um zelllinienspezifische Effekte auszuschließen.

3.1 Etablierung eines FTO-Knock-Downs

Um den Einfluss der m⁶A-Demethylase FTO bei der Entstehung einer kardialen Hypertrophie untersuchen zu können, wurde zunächst mit Hilfe einer siRNA ein FTO-Knock-Down in den hiPSC-CMs erzeugt. Dazu wurden die Zellen in zwei Gruppen aufgeteilt (Versuchsgruppe und Kontrollgruppe). Die Versuchsgruppe wurde mit einer FTO-siRNA und die Kontrollgruppe mit einer siRNA-negativ-Kontrolle (siKontrolle) behandelt (s. Tabelle 49 und Abschnitt 2.3). Der Erfolg des FTO-Knock-Downs wurde 48 Stunden nach der siRNA-Transfektion untersucht. Für die Zelllinie WT-D2-1u wurde der erfolgreiche FTO-Knock-Down sowohl auf mRNA-Ebene mittels qPCR-Analyse als auch auf Protein-Ebene mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen (Abbildungen 1A – C und 1D). Für die Zelllinie pCTRL1.1 wurde der erfolgreiche FTO-Knock-Down auf mRNA-Ebene mittels qPCR-Analyse nachgewiesen (Abbildung 1E). Mithilfe der FTO-siRNA konnte also in beiden Zelllinien erfolgreich ein Mangel an FTO erzeugt werden, allerdings war die Herunterregulation in der Zelllinie WT-D2-1u tendenziell etwas stärker ausgeprägt.

Tabelle 49: Versuchsprotokoll für den FTO-Knock-Down mittels siRNA-Transfektion

Tag	Behandlung	Vergangene Zeit (Stunden)
-1	Mediumwechsel	-24
0	siRNA-Transfektion	0
1	Ruhetag	24
2	Ernte	48

Das Medium wurde 24 Stunden vor dem Start der Behandlung gewechselt. An Tag 0 erfolgte die siRNA-Transfektion. Die siRNA wurde für 48 Stunden bis zur Ernte an Tag 2 im Medium belassen. Nach der Ernte erfolgte die molekulare Analyse der hiPSC-CMs.

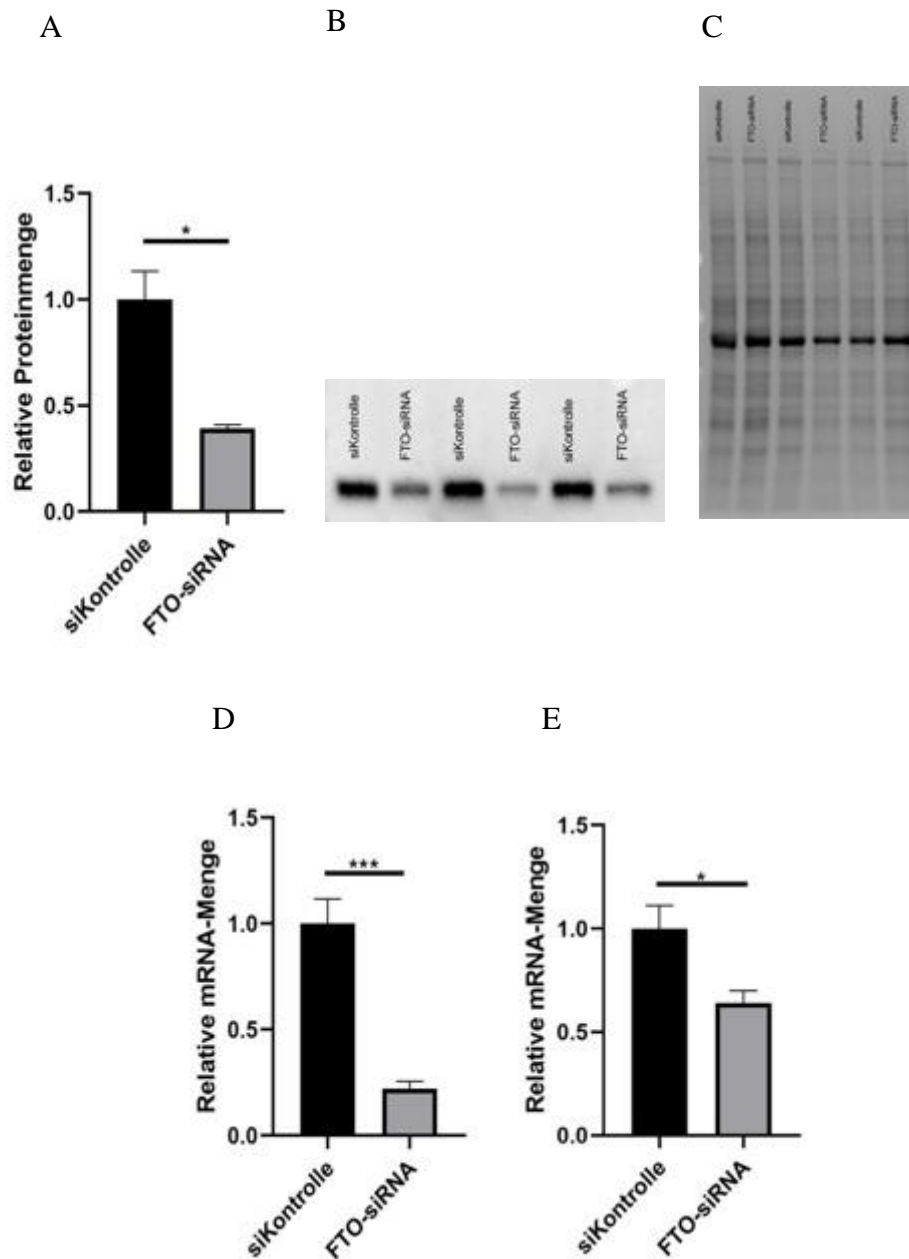


Abbildung 1: FTO-Knock-Down 48 Stunden nach der siRNA-Transfektion. (A) Western-Blot-Analyse des FTO-Proteins. Zelllinie WT-D2-1u. Die Menge des FTO-Proteins wurde auf das Gesamtprotein normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler. $n = 3$ für beide Gruppen. Statistik: ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur. $* = p \leq 0,05$. (B) Western Blot des FTO-Proteins. Zelllinie WT-D2-1u. (C)

Western Blot des Gesamtproteins. Zelllinie WT-D2-1u. (D) qPCR-Analyse der FTO-mRNA. Zelllinie WT-D2-1u. Die Menge der FTO-mRNA wurde auf die S18-mRNA normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler. siKontrolle n = 6, FTO-siRNA n = 4. Statistik: ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur. *** = $p \leq 0,001$. (E) qPCR-Analyse der FTO-mRNA. Zelllinie pCTRL1.1. Die Menge der FTO-mRNA wurde auf die S18-mRNA normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler. n = 5 für beide Gruppen. Statistik: ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur. * = $p \leq 0,05$.

3.2 Kombination des FTO-Knock-Downs mit der Endothelin-1-Behandlung – Etablierung eines Versuchsprotokolls

Die Induktion der Hypertrophie der hiPSC-CMs sollte durch Endothelin-1-Stimulation erfolgen (s. Tabelle 50 und Abschnitt 2.4). Daher musste in einem nächsten Schritt der FTO-Knock-Down mit der Endothelin-1-Behandlung der Kardiomyozyten verbunden werden. Da die ET-1-Behandlung der Zellen 48 Stunden dauern und das FTO-Protein bereits zu Beginn der Stressestimulation herunterreguliert sein sollte, war es notwendig, den *knock down* nach mehr als 48 Stunden nachzuweisen. Dazu wurden die Zellen zunächst mit FTO-siRNA oder siRNA-negativ-Kontrolle behandelt. Nach den ersten 48 Stunden erfolgte die Behandlung mit ET-1 oder ein normaler Mediumwechsel. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen geerntet (s. Tabelle 51 und Abschnitt 2.5) und die Menge der FTO-mRNA mittels qPCR-Analyse sowie die Menge des FTO-Proteins mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Die Menge des FTO-Proteins war auch 96 Stunden nach der siRNA-Transfektion noch deutlich verringert (Abbildungen 2B – D), aber eine Reduktion des FTO-mRNA-Levels konnte nicht mehr nachgewiesen werden (Abbildung 2A). Darüber hinaus zeigte sich kein Einfluss der ET-1-Behandlung auf den FTO-Knock-Down, da es keinen Unterschied zwischen den mRNA- oder Proteinleveln der *Knock-Down*- und der *Knock-Down* + ET-1-Gruppe gab (Abbildungen 2A und 2B – D). Weiterführend wurde das Behandlungsprotokoll abgeändert, um die FTO-Herunterregulation noch weiter zu optimieren. Hierfür wurden die Zellen 24 Stunden nach der ersten Transfektion erneut mit siRNA behandelt. 24 Stunden nach der zweiten Transfektion erfolgte die Behandlung mit ET-1 oder ein normaler Mediumwechsel. Schließlich erfolgte die Ernte der Zellen nach weiteren 48 Stunden (s. Tabelle 52 und Abschnitt 2.6). Der Erfolg des FTO-Knock-Downs 72 Stunden nach der zweiten Transfektion wurde mittels Western-Blot-Analyse und Immunfluoreszenz-Färbung untersucht. In der Western-Blot-Analyse zeigte sich sowohl bei der Zelllinie WT-D2-1u

(Abbildungen 3D – F) als auch bei der Zelllinie pCTRL1.1 (Abbildungen 3A – C) eine deutliche Reduktion des FTO-Levels. Allerdings war die Herunterregulation des FTO-Proteins in der Zelllinie WT-D2-1u tendenziell etwas stärker ausgeprägt. Auch in der Immunfluoreszenz-Färbung zeigte sich eine sichtbare Reduktion des FTO-Proteins in der *Knock-Down*-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 3G). Doch obwohl FTO in der Kontrollgruppe sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma vorhanden war, betraf der *knock down* hauptsächlich das nukleäre FTO, während sich das zytoplasmatische FTO eher unbeeinflusst zeigte.

Tabelle 50: Versuchsprotokoll für die Endothelin-1-Behandlung

Tag	Behandlung	Vergangene Zeit (Stunden)
-1	Mediumwechsel	-24
0	ET-1-Stimulation	0
1	Ruhetag	24
2	Ernte	48

Das Medium wurde 24 Stunden vor dem Start der Behandlung gewechselt. An Tag 0 wurden die hiPSC-CMs mit ET-1 behandelt. Das ET-1 wurde für 48 Stunden bis zur Ernte an Tag 2 im Medium belassen. Nach der Ernte erfolgte die molekulare Analyse der hiPSC-CMs.

Tabelle 51: 96-Stunden-Versuchsprotokoll für die Kombination des FTO-*Knock-Downs* mit der ET-1-Behandlung

Tag	Behandlung	Vergangene Zeit (Stunden)
-1	Mediumwechsel	-24
0	siRNA-Transfektion	0
1	Ruhetag	24
2	ET-1-Stimulation	48
3	Ruhetag	72
4	Ernte	96

Das Medium wurde 24 Stunden vor dem Start der Behandlung gewechselt. An Tag 0 erfolgte die siRNA-Transfektion. Die siRNA wurde für 48 Stunden bis zur ET-1-

Behandlung an Tag 2 im Medium belassen. Das ET-1 wurde ebenfalls für 48 Stunden bis zur Ernte an Tag 4 im Medium belassen. Nach der Ernte erfolgte die molekulare Analyse der hiPSC-CMs.

Tabelle 52: 72-Stunden-Versuchsprotokoll für die Kombination des FTO-Knock-Downs mit der ET-1-Behandlung

Tag	Behandlung	Vergangene Zeit insgesamt (Stunden)	Vergangene Zeit seit der letzten Transfektion (Stunden)
-1	Mediumwechsel	-24	-24
0	siRNA-Transfektion 1	0	0
1	siRNA-Transfektion 2	24	24
2	ET-1-Stimulation	48	24
3	Ruhetag	72	48
4	Ernte	96	72

Das Medium wurde 24 Stunden vor dem Start der Behandlung gewechselt. An Tag 0 erfolgte die erste siRNA-Transfektion. Die siRNA wurde für 24 Stunden bis zur zweiten siRNA-Transfektion an Tag 1 im Medium belassen. Die frische siRNA wurde erneut für 24 Stunden bis zur ET-1-Behandlung an Tag 2 im Medium belassen. Das ET-1 wurde für 48 Stunden bis zur Ernte an Tag 4 im Medium belassen. Nach der Ernte erfolgte die molekulare Analyse der hiPSC-CMs.

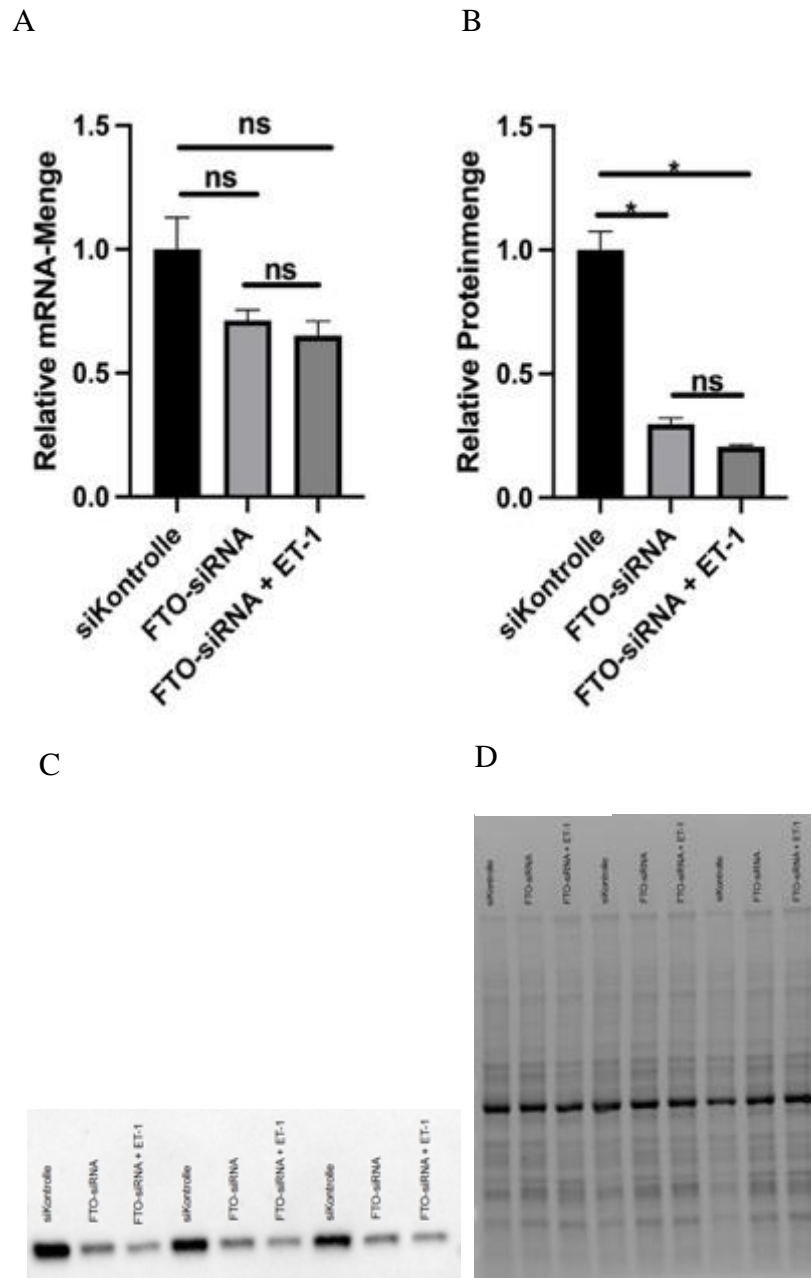
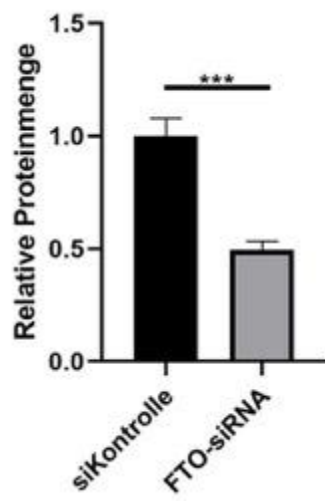


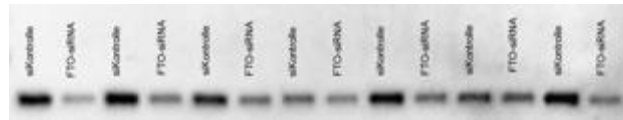
Abbildung 2: FTO-Knock-Down 96 Stunden nach der siRNA-Transfektion.

(A) qPCR-Analyse der FTO-mRNA. Zelllinie WT-D2-1u. Die Menge der FTO-mRNA wurde auf die S18-mRNA normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler. $n = 6$ für alle drei Gruppen. Statistik: Einfaktorielle Varianzanalyse mit Welch-Korrektur und nachfolgendem Dunnett-T3-mehrfacher-Vergleich-Test. ns = nicht signifikant. (B) Western-Blot-Analyse des FTO-Proteins. Zelllinie WT-D2-1u. Die Menge des FTO-Proteins wurde auf das Gesamtprotein normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler. $n = 3$ für alle drei Gruppen. Statistik: Einfaktorielle Varianzanalyse mit Welch-Korrektur und nachfolgendem Dunnett-T3-mehrfacher-Vergleich-Test. * = $p \leq 0,05$, ns = nicht signifikant. (C) Western Blot des FTO-Proteins. Zelllinie WT-D2-1u. (D) Western Blot des Gesamtproteins. Zelllinie WT-D2-1u.

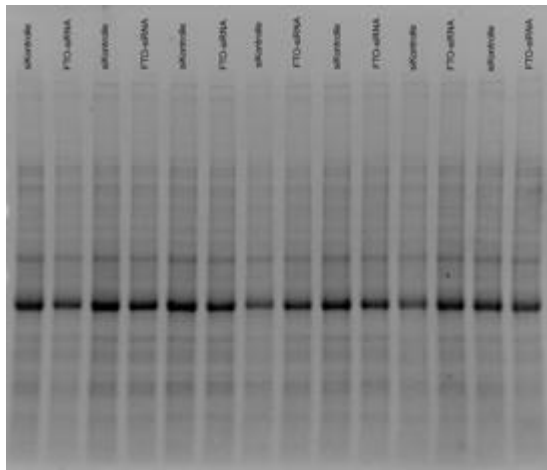
A



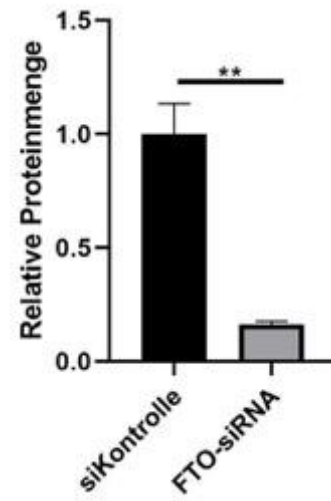
B



C



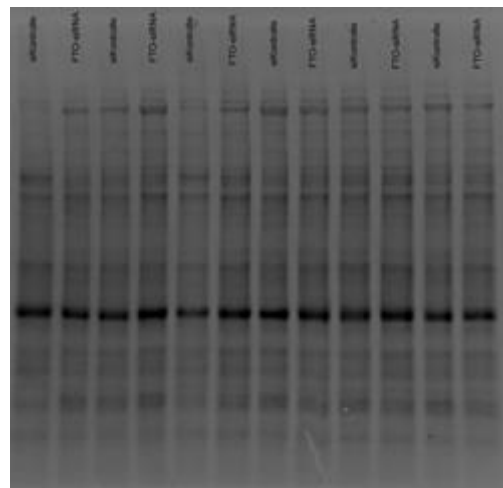
D



E



F



G

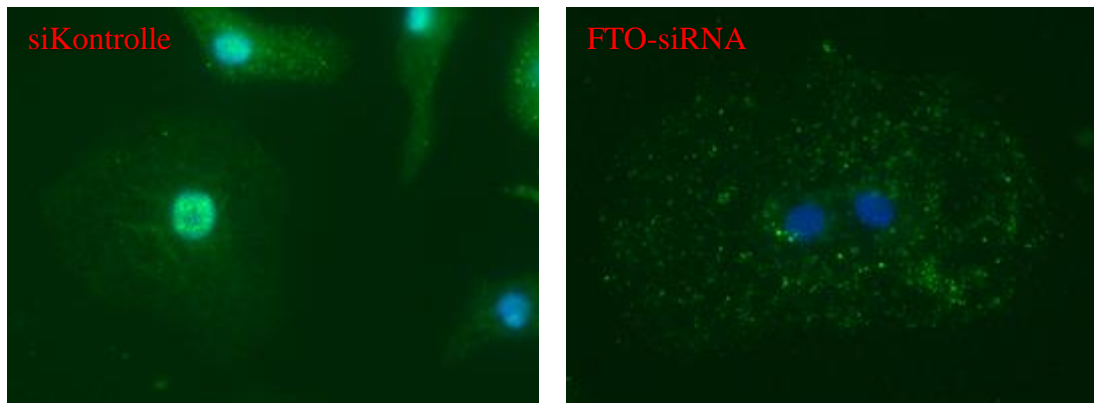


Abbildung 3: FTO-Knock-Down 72 Stunden nach der siRNA-Transfektion.

(A) Western-Blot-Analyse des FTO-Proteins. Zelllinie pCTRL1.1. Die Menge des FTO-Proteins wurde auf das Gesamtprotein normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler. $n = 7$ für beide Gruppen. Statistik: ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur. $*** = p \leq 0,001$. (B) Western Blot des FTO-Proteins. Zelllinie pCTRL1.1. (C) Western Blot des Gesamtproteins. Zelllinie pCTRL1.1 (D) Western-Blot-Analyse des FTO-Proteins. Zelllinie WT-D2-1u. Die Menge des FTO-Proteins wurde auf das Gesamtprotein normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler. $n = 6$ für beide Gruppen. Statistik: ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur. $** = p \leq 0,01$. (E) Western Blot des FTO-Proteins. Zelllinie WT-D2-1u. (F) Western Blot des Gesamtproteins. Zelllinie WT-D2-1u. (G) Immunfluoreszenz-Färbung für FTO (grün) und DAPI (blau). Zelllinie WT-D2-1u.

3.3 Einfluss der Endothelin-1-Stimulation auf die Menge des FTO-Proteins

Als nächstes wurde überprüft, ob die ET-1-Behandlung einen Einfluss auf die Menge des FTO-Proteins hat. Dazu wurden die Zellen in zwei Gruppen aufgeteilt (Versuchsgruppe und Kontrollgruppe). Die Versuchsgruppe wurde mit ET-1 behandelt, während die Kontrollgruppe nur einem normalen Mediumwechsel unterzogen wurde. Nach 48 Stunden wurden die hiPSC-CMs geerntet (s. Tabelle 50 und Abschnitt 2.4) und das FTO-Level mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Das FTO-Level der mit ET-1 behandelten Zellen unterschied sich nicht von dem der Kontrollgruppe (Abbildungen 4A – C). Folglich konnte kein Einfluss der ET-1-Behandlung auf die Menge des FTO-Proteins gefunden werden.

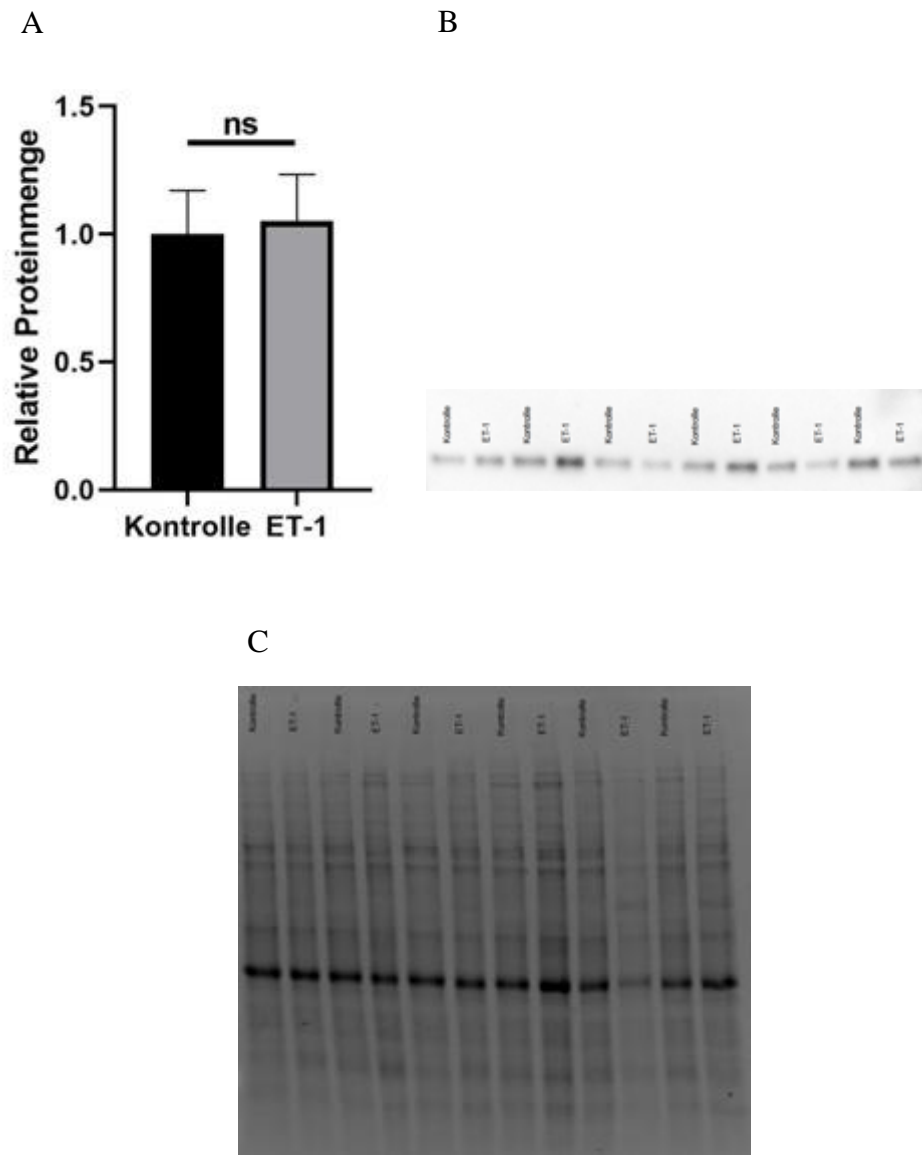
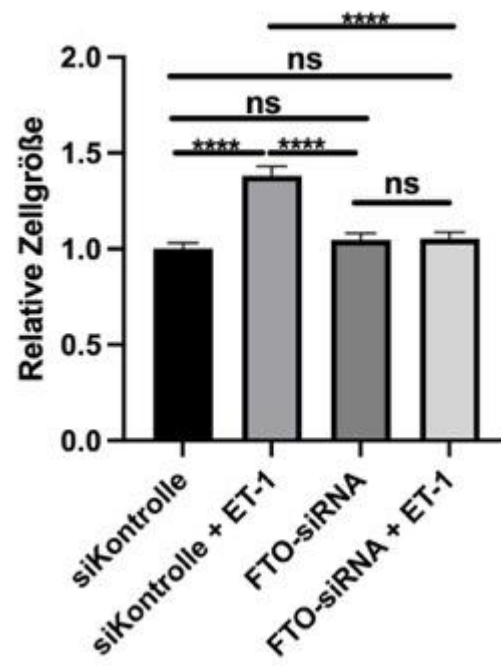


Abbildung 4: Einfluss der ET-1-Stimulation auf die Menge des FTO-Proteins. (A) Western-Blot-Analyse des FTO-Proteins. Zelllinie WT-D2-1u. Die Menge des FTO-Proteins wurde auf das Gesamtprotein normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler. $n = 6$ für beide Gruppen. Statistik: ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur. ns = nicht signifikant. (B) Western Blot des FTO-Proteins. Zelllinie WT-D2-1u. (C) Western Blot des Gesamtproteins. Zelllinie WT-D2-1u.

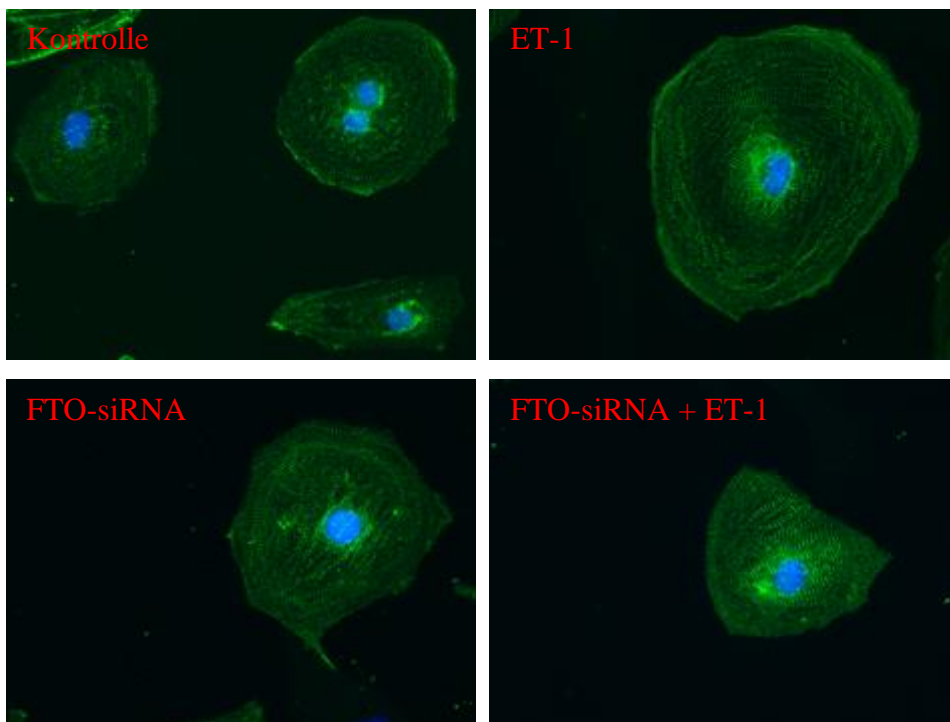
3.4 Einfluss des *FTO-Knock-Downs* auf die Endothelin-1-induzierte Hypertrophie

Nach der erfolgreichen Etablierung des *FTO-Knock-Downs* und der Kombination desselben mit der ET-1-Behandlung wurde untersucht, ob der FTO-Mangel die durch ET-1 induzierte Hypertrophie beeinflusst. Dazu wurden die Zellen in vier Gruppen aufgeteilt (Kontrollgruppe, ET-1-Gruppe, *FTO-Knock-Down*-Gruppe, *FTO-Knock-Down*- + ET-1-Gruppe) und nach dem 72-Stunden-Protokoll behandelt (s. Tabelle 52 und Abschnitt 2.6). Um die Größe der Zellen zu bestimmen, wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung für α -Actinin durchgeführt (Abbildungen 5B und 5D). Anschließend wurden die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop fotografiert, die Zelloberfläche ausgemessen und eine statistische Analyse durchgeführt. In beiden Zelllinien konnte die erfolgreiche Induktion einer Hypertrophie durch ET-1 gezeigt werden: Die Kardiomyozyten der ET-1-Gruppe waren im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe signifikant vergrößert (Abbildungen 5A und 5C). Bei der Zelllinie WT-D2-1u waren die Zellen um $42 \% \pm 8,2 \%$ vergrößert; die Zellen der Linie pCTRL1.1 vergrößerten sich um $38,3 \% \pm 4,8 \%$. Interessanterweise waren in beiden Zelllinien die Kardiomyozyten der *FTO-Knock-Down*- + ET-1-Gruppe im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe nicht vergrößert (Abbildungen 5A und 5C). Der Mangel an FTO schwächte also die Hypertrophie nicht nur ab, sondern verhinderte deren Entstehung gänzlich. Darüber hinaus zeigte sich in der Zelllinie pCTRL1.1 die Größe der Zellen der *FTO-Knock-Down*-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert (Abbildung 5A). In dieser Zelllinie hatte die Herunterregulation des FTO-Proteins also keinen Effekt auf die basale Zellgröße, in der Zelllinie WT-D2-1u hingegen schon. Hier waren die Herzmuskelzellen der *FTO-Knock-Down*-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe um $25,6 \% \pm 3,8 \%$ verkleinert (Abbildung 5C).

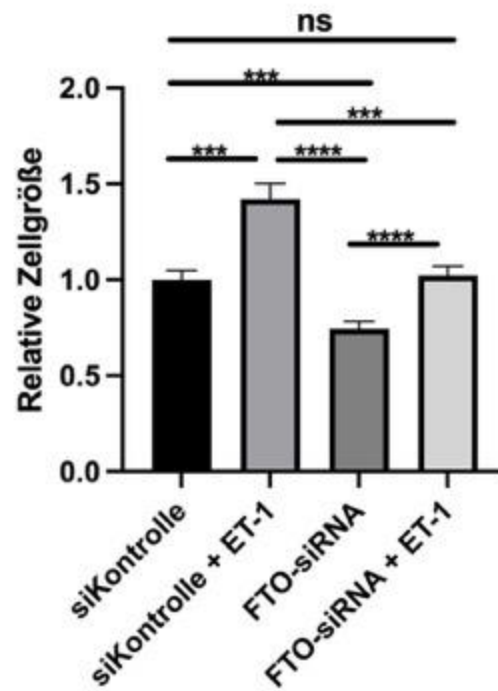
A



B



C



D

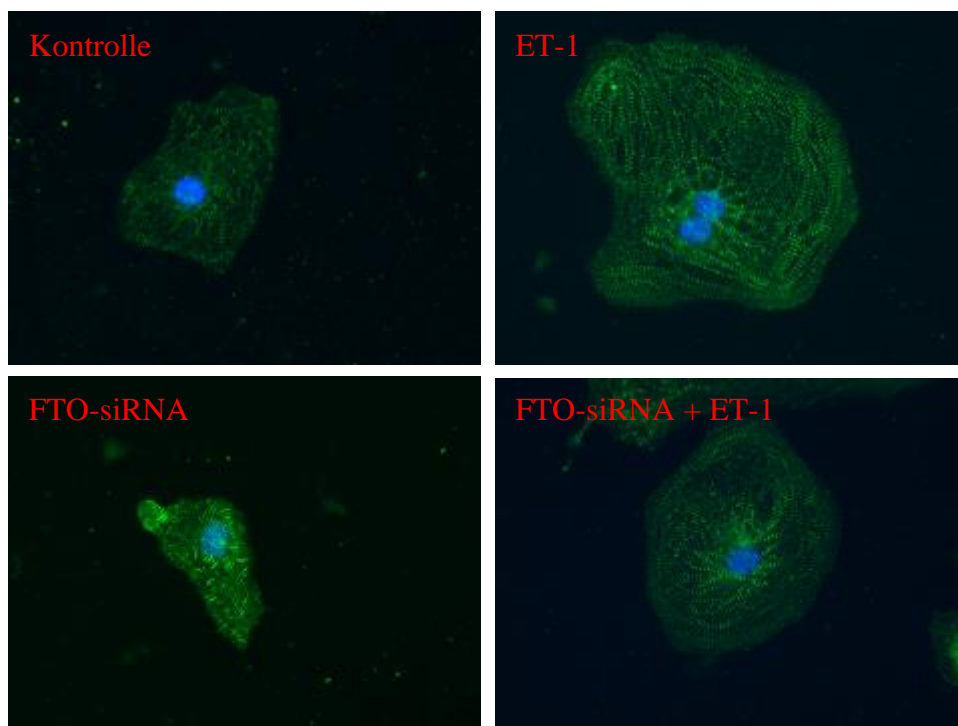


Abbildung 5: Einfluss des FTO-Knock-Downs auf die Endothelin-1-induzierte Hypertrophie. (A) Zellgrößen-Analyse. Zelllinie pCTRL1.1. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler. siKontrolle n = 304, siKontrolle + ET-1 n = 291, FTO-

siRNA n = 255, FTO-siRNA + ET-1 n = 274. Statistik: Einfaktorielle Varianzanalyse mit Welch-Korrektur und nachfolgendem Games-Howell-mehrfacher-Vergleich-Test. **** = $p \leq 0,0001$, ns = nicht signifikant. (B) Immunfluoreszenz-Färbung für α -Actinin (grün) und DAPI (blau). Zelllinie pCTRL1.1. (C) Zellgrößen-Analyse. Zelllinie WT-D2-1u. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler. siKontrolle n = 148, siKontrolle + ET-1 n = 123, FTO-siRNA n = 161, FTO-siRNA + ET-1 n = 137. Statistik: Einfaktorielle Varianzanalyse mit Welch-Korrektur und nachfolgendem Games-Howell-mehrfacher-Vergleich-Test. *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$, ns = nicht signifikant. (D) Immunfluoreszenz-Färbung für α -Actinin (grün) und DAPI (blau). Zelllinie WT-D2-1u.

3.5 Einfluss des FTO-Knock-Downs auf die Endothelin-1-induzierte Synthese des Hypertrophie-Markers ANP

Nachdem festgestellt wurde, dass der FTO-Knock-Down die Entwicklung der ET-1-induzierten Hypertrophie verhindert, wurde weiterführend der Einfluss des FTO-Mangels auf die ET-1-induzierte Synthese des Hypertrophie-Markers ANP untersucht. Dazu wurden die Zellen erneut in vier Versuchsgruppen aufgeteilt (Kontrollgruppe, ET-1-Gruppe, FTO-Knock-Down-Gruppe, FTO-Knock-Down- + ET-1-Gruppe) und nach dem 72-Stunden-Protokoll behandelt (s. Tabelle 52 und Abschnitt 2.6). Nach der Ernte der Kardiomyozyten wurde eine Western-Blot-Analyse des ANP-Proteins durchgeführt. Das ANP-Level der ET-1-Gruppe war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht, was den Erfolg der ET-1-Stimulation bestätigte (Abbildungen 6A – C). Im Gegensatz dazu war das ANP-Level der FTO-Knock-Down-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert (Abbildungen 6A – C). Der FTO-Mangel hatte also keine Auswirkungen auf die basale ANP-Produktion. Im Gegensatz dazu wurde die ET-1-induzierte Steigerung der ANP-Synthese durch den FTO-Knock-Down abgeschwächt: Die Menge des ANP-Proteins war in der FTO-Knock-Down- + ET-1-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zwar erhöht, aber im Vergleich zur ET-1-Gruppe verringert (Abbildungen 6A – C). Der Anstieg des ANP-Levels konnte in der FTO-Knock-Down- + ET-1-Gruppe also noch beobachtet werden, aber in geringerem Ausmaß als in der Gruppe, die nur mit ET-1 behandelt wurde.

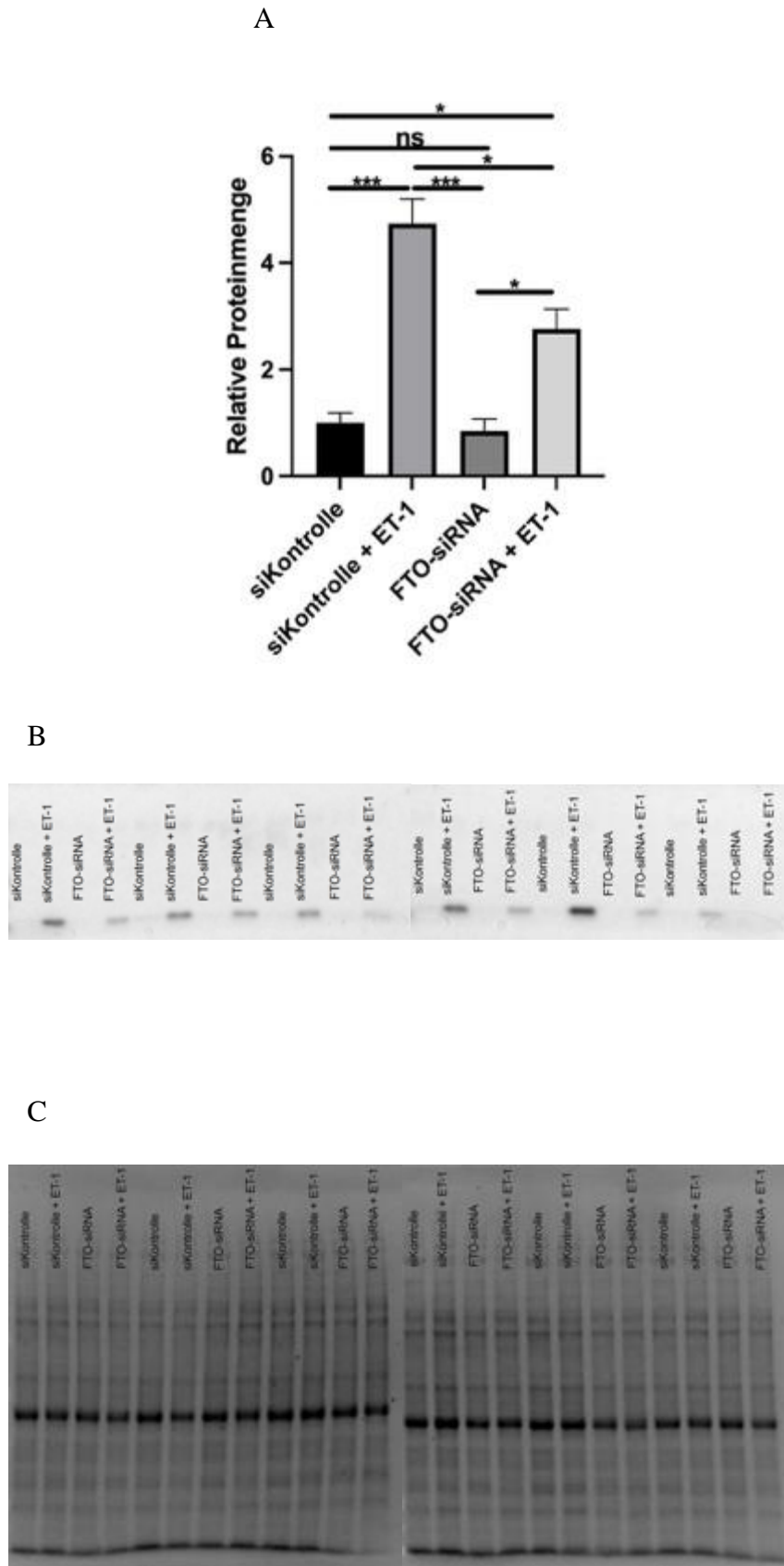


Abbildung 6: Einfluss des FTO-Knock-Downs auf die Endothelin-1-induzierte ANP-Synthese. (A) Western-Blot-Analyse des ANP-Proteins. Zelllinie pCTRL1.1. Die Menge des ANP-Proteins wurde auf das Gesamtprotein normalisiert. Dargestellt ist der

Mittelwert mit Standardfehler. $n = 6$ für alle vier Gruppen. Statistik: Einfaktorielle Varianzanalyse mit Welch-Korrektur und nachfolgendem Dunnett-T3-mehrfacher-Vergleich-Test. * = $p \leq 0,05$, *** = $p \leq 0,001$, ns = nicht signifikant. (B) Western Blot des ANP-Proteins. Zelllinie pCTRL1.1. (C) Western Blot des Gesamtproteins. Zelllinie pCTRL1.1.

3.6 Einfluss des FTO-Knock-Downs auf die Synthese des ERK1/2-Proteins

Um herauszufinden, ob der FTO-Knock-Down die ET-1-induzierte Hypertrophie und ANP-Synthese verhindert bzw. abschwächt, indem er Proteine des ERK1/2-MAPK-Signalwegs beeinflusst, welcher durch ET-1 aktiviert wird, wurde das ERK1/2-Protein untersucht. Dazu wurden die Zellen wieder in vier Versuchsgruppen aufgeteilt (Kontrollgruppe, ET-1-Gruppe, FTO-Knock-Down-Gruppe, FTO-Knock-Down- + ET-1-Gruppe) und nach dem 72-Stunden-Protokoll behandelt (s. Tabelle 52 und Abschnitt 2.6). Nach der Ernte der Herzmuskelzellen wurde eine Western-Blot-Analyse des ERK1/2-Proteins durchgeführt. Sowohl das ERK1- als auch das ERK2-Level waren weder durch die ET-1-Stimulation noch durch den FTO-Knock-Down verändert: Es zeigte sich für keine der drei Versuchsgruppen (ET-1-Gruppe, FTO-Knock-Down-Gruppe, FTO-Knock-Down- + ET-1-Gruppe) ein signifikanter Unterschied in der ERK1/2-Proteinmenge im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildungen 7A – D).

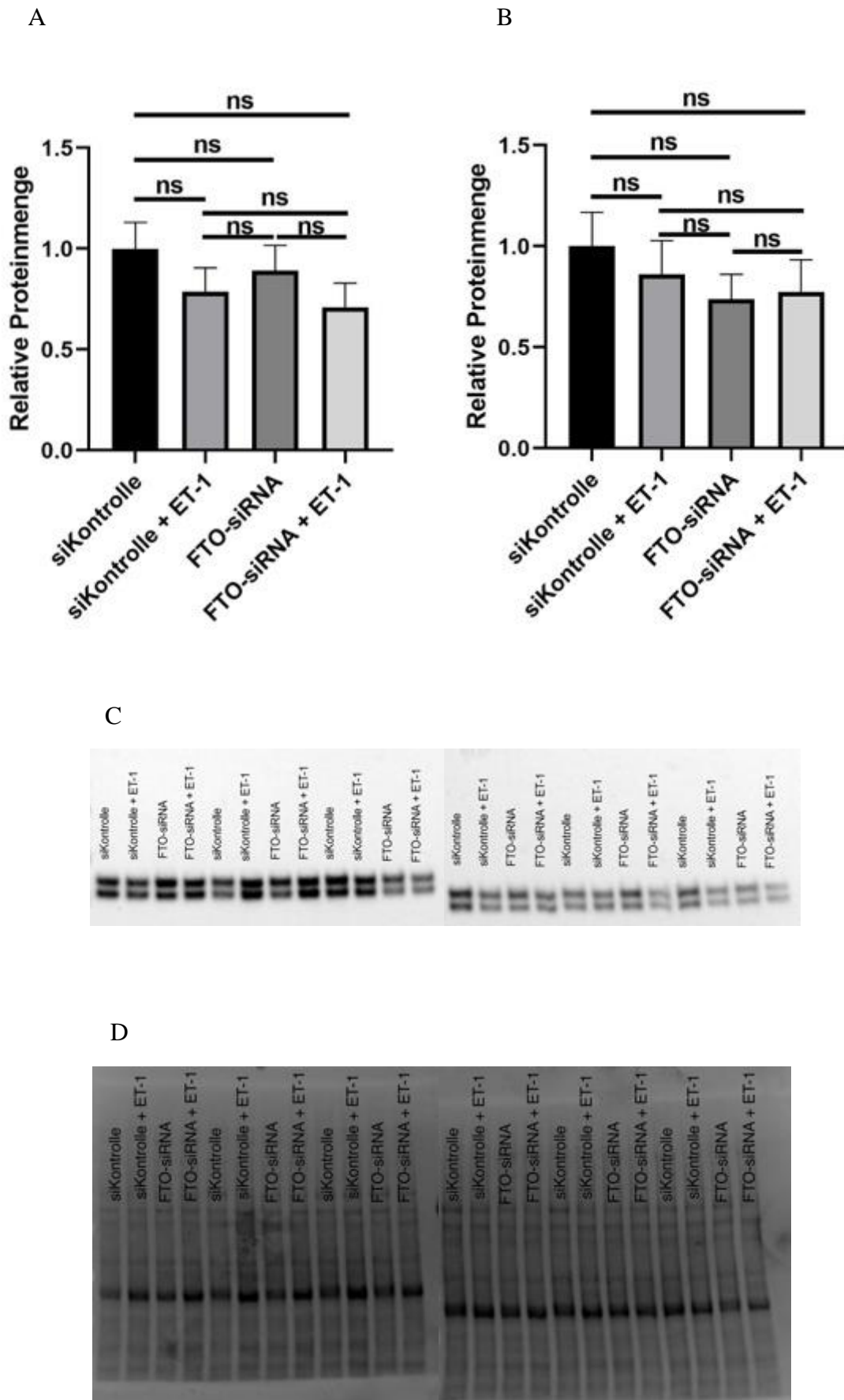


Abbildung 7: Einfluss des FTO-Knock-Downs auf die Menge des ERK1/2-Proteins.

(A) Western-Blot-Analyse des ERK1-Proteins. Zelllinie pCTRL1.1. Die Menge des

ERK1-Proteins wurde auf das Gesamtprotein normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler. $n = 6$ für alle vier Gruppen. Statistik: Einfaktorielle Varianzanalyse mit Welch-Korrektur und nachfolgendem Dunnett-T3-mehrfacher-Vergleich-Test. ns = nicht signifikant. (B) Western-Blot-Analyse des ERK2-Proteins. Zelllinie pCTRL1.1. Die Menge des ERK2-Proteins wurde auf das Gesamtprotein normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler. $n = 6$ für alle vier Gruppen. Statistik: Einfaktorielle Varianzanalyse mit Welch-Korrektur und nachfolgendem Dunnett-T3-mehrfacher-Vergleich-Test. ns = nicht signifikant. (C) Western Blot des ERK1/2-Proteins. Zelllinie pCTRL1.1. (D) Western Blot des Gesamtproteins. Zelllinie pCTRL1.1.

3.7 Einfluss des FTO-*Knock-Downs* auf die m⁶A-Verteilung und -Menge

Als nächstes wurde die m⁶A-Verteilung und -Menge in den Kardiomyozyten untersucht, um herauszufinden, wie sich der FTO-*Knock-Down* auf diese auswirkt. Hierzu wurden die Zellen wieder in vier Versuchsgruppen aufgeteilt (Kontrollgruppe, ET-1-Gruppe, FTO-*Knock-Down*-Gruppe, FTO-*Knock-Down*- + ET-1-Gruppe) und nach dem 72-Stunden-Protokoll behandelt (s. Tabelle 52 und Abschnitt 2.6). Anschließend wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung für m⁶A durchgeführt (Abbildung 8). Weder der FTO-*Knock-Down* noch die ET-1-Behandlung beeinflussten die m⁶A-Verteilung oder -Menge sichtbar: Keine der drei Versuchsgruppen (ET-1-Gruppe, FTO-*Knock-Down*-Gruppe, FTO-*Knock-Down*- + ET-1-Gruppe) unterschied sich in der Immunfluoreszenz-Färbung optisch von der Kontrollgruppe.

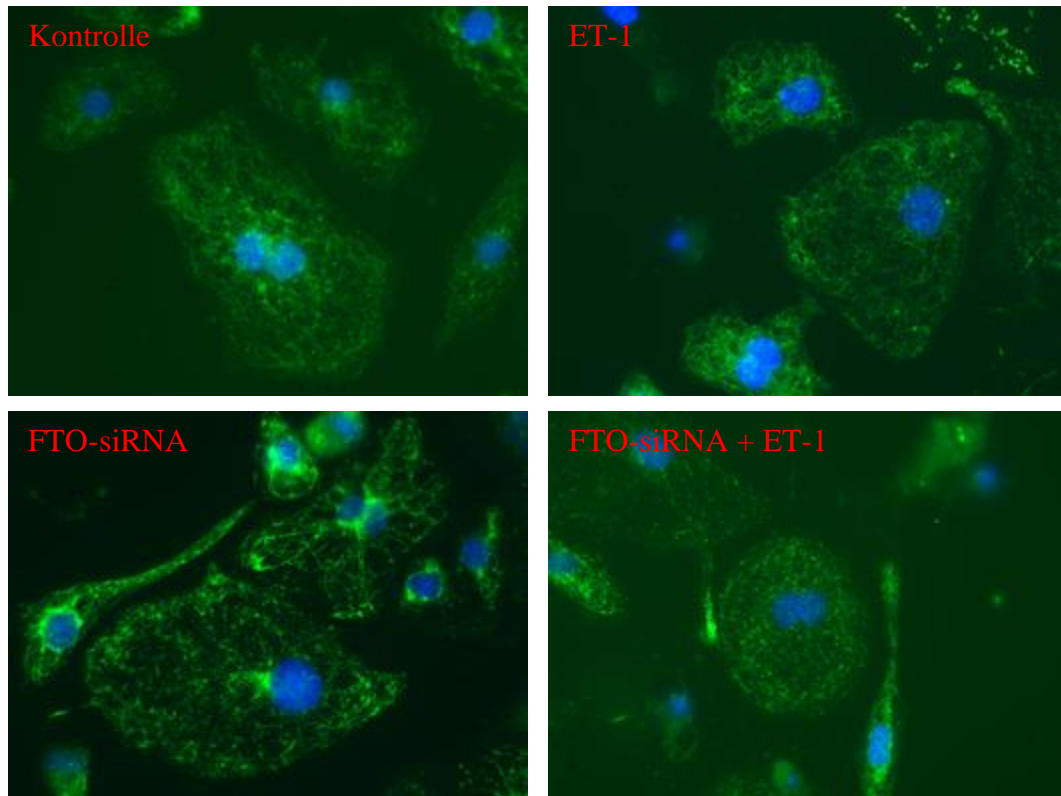


Abbildung 8: Einfluss des FTO-Knock-Downs auf die m⁶A-Verteilung und -Menge. Immunfluoreszenzfärbung für m⁶A (grün) und DAPI (blau). Zelllinie pCTRL1.1.

4 Diskussion

Die m⁶A-Modifikation und ihre Regulatoren wurden in den letzten Jahren zunehmend untersucht und ihre Wichtigkeit bei Entwicklungsprozessen und verschiedenen Krankheiten wurde entdeckt (Zaccara et al. 2019; Longenecker et al. 2020). Auch bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz scheint m⁶A eine wichtige Rolle zu spielen (Dorn et al. 2019; Mathiyalagan et al. 2019; Berulava et al. 2020; Shen et al. 2021). Trotzdem gibt es bisher erst wenige Studien, die den Zusammenhang von m⁶A und Herzinsuffizienz betrachtet haben. Insbesondere die Rolle der Demethylase FTO ist in diesem Zusammenhang bisher kaum beleuchtet worden. Daher habe ich in meiner Arbeit die Auswirkungen eines FTO-Mangels auf die Entstehung einer Kardiomyozyten-Hypertrophie untersucht.

4.1 hiPSC-Kardiomyozytenmodell

In dieser Arbeit wurden mindestens 60 Tage alte hiPSC-CMs als in vitro-Modell verwendet. Diese 60 Tage oder älteren hiPSC-CMs verfügen über eine Kardiomyozyten-spezifische Genexpression und Morphologie, die der von humanen adulten Herzmuskelzellen gleicht (Shinozawa et al. 2012). Daher scheinen die hiPSC-CMs ein geeignetes Modell zu sein, um den Einfluss von FTO bei der Entstehung einer Hypertrophie zu untersuchen.

4.2 Etablierung eines FTO-Knock-Downs

siRNAs werden schon seit langer Zeit für den *knock down* von Ziel-Transkripten verwendet, da sie komplementäre mRNAs binden und deren Abbau induzieren (Schramke und Allshire 2004; Carthew und Sontheimer 2009). Wie die Ergebnisse zeigen, ließ sich auch in hiPSC-CMs mithilfe einer FTO-siRNA eine signifikante Herunterregulation des FTO-Proteins erreichen, die bis zu 96 Stunden nach der Transfektion anhielt (s. Abbildungen 1 – 3). Dabei scheint der Erfolg des FTO-Knock-Downs zelllinienunabhängig zu sein, da die signifikante Verringerung des FTO-Levels in zwei verschiedenen Zelllinien gezeigt werden konnte (s. Abbildungen 1D – E und 3A – F). Allerdings scheint die Zelllinie WT-D2-1u tendenziell besser auf die siRNA zu reagieren, da in dieser der FTO-Mangel etwas stärker ausgeprägt war.

4.3 Endothelin-1-Stimulation

Es ist schon lange bekannt, dass Endothelin-1 eine kardiale Hypertrophie verursachen kann (Ito et al. 1991; Miyauchi und Masaki 1999; Archer et al. 2017; Miyauchi und Sakai 2019). Auch bei den hiPSC-CMs konnte mit 3 nM ET-1 erfolgreich eine Kardiomyozyten-Hypertrophie ausgelöst werden (s. Abbildung 5). Zudem ließ sich die ET-1-Behandlung erfolgreich mit dem FTO-*Knock-Down* kombinieren (s. Abbildungen 2 und 3). Dabei hatte die ET-1-Behandlung selbst keinen Einfluss auf die Menge des FTO-Proteins (s. Abbildungen 2 und 4). Der FTO-*Knock-Down* wurde dadurch also weder verstärkt noch abgeschwächt. Damit scheint ET-1 kein Regulator der FTO-Expression zu sein. Folglich werden auch die Effekte von ET-1 nicht durch eine Änderung der FTO-Menge vermittelt.

4.4 Einfluss des FTO-*Knock-Downs* auf die Endothelin-1-induzierte Hypertrophie

In dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich ein Mangel an FTO auf die Entstehung einer Kardiomyozyten-Hypertrophie auswirkt. Die Ergebnisse zeigen, dass ein FTO-*Knock-Down* die ET-1-induzierte Hypertrophie verhindert (s. Abbildung 5). Da der Effekt in beiden Zelllinien beobachtet werden konnte, scheint er zelllinienunabhängig zu sein. Allerdings hatte der FTO-*Knock-Down* in der Zelllinie WT-D2-1u auch Auswirkungen auf die basale Zellgröße: Er verkleinerte die Zellen. In der Zelllinie pCTRL1.1 hingegen blieb die basale Zellgröße unverändert. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, dass der Effekt des *knock downs* auf die Zellgröße bei der Zelllinie WT-D2-1u größer war, weil in dieser auch der FTO-Mangel etwas stärker ausgeprägt war (s. Abbildungen 1D – E und 3A – F). Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass die Zelllinie WT-D2-1u einen schnelleren Umsatz der Strukturproteine hat und sich daher der FTO-*Knock-Down* bereits nach kurzer Zeit auf die basale Zellgröße ausgewirkt hat. Dann wäre davon auszugehen, dass sich nach längerer Zeit auch die basale Zellgröße der Zelllinie pCTRL1.1 verringern würde.

4.5 Einfluss des FTO-*Knock-Downs* auf die Endothelin-1-induzierte Synthese des Hypertrophie-Markers ANP

Endothelin-1 steigert bekanntermaßen auch die Produktion des Hypertrophie-Markers ANP (Miyauchi und Masaki 1999; Archer et al. 2017; Miyauchi und Sakai 2019). Daher

wurde in dieser Arbeit ebenfalls der Einfluss des *FTO-Knock-Downs* auf die Bildung von ANP untersucht. Dabei zeigte sich, dass der *FTO-Mangel* die *ET-1-induzierte ANP-Synthese* abschwächt (s. Abbildung 6). Auf die basale ANP-Produktion hatte der *knock down* hingegen keine Auswirkungen, was daran liegen könnte, dass diese unter Normalbedingungen recht gering ist. Erst bei Herzinsuffizienz produzieren die ventrikulären Herzmuskelzellen eine größere Menge ANP (Fu et al. 2018). Dazu passend konnte unter *ET-1-Stimulation* eine Steigerung des ANP-Levels um mehr als das Vierfache beobachtet werden (s. Abbildung 6).

4.6 Einfluss des *FTO-Knock-Downs* auf den ERK1/2-MAPK-Signalweg

Weiterführend wurde in dieser Arbeit der Einfluss des *FTO-Knock-Downs* auf den *ERK1/2-MAPK-Signalweg* untersucht, da die *ET-1-induzierte Hypertrophie* und *ANP-Synthese* durch diesen vermittelt werden (Yue et al. 2000; Archer et al. 2017). Die Menge des *ERK1/2-Proteins* war durch den *knock down* nicht verändert (s. Abbildung 7). Auch die *ET-1-Stimulation* veränderte das *ERK1/2-Proteinlevel* nicht (s. Abbildung 7), was zu erwarten war, da die Signalkaskade über Phosphorylierungen der Proteine vermittelt wird und nicht über Expressionssteigerungen dieser (Kehat und Molkenin 2010). Da der *FTO-Mangel* die *ERK1/2-Proteinmenge* nicht verändert hat und zudem kein Einfluss von *FTO* auf Protein-Phosphorylierungen bekannt ist, ist anzunehmen, dass der *knock down* keine Auswirkungen auf den *ERK1/2-MAPK-Signalweg* hat und die Verhinderung bzw. Abschwächung der *ET-1-induzierten Hypertrophie* und *ANP-Synthese* daher nicht auf einer Beeinträchtigung dieser Signalkaskade beruht. Möglicherweise könnten aber andere Signalwege durch den *FTO-Mangel* beeinflusst worden sein. Um dieser Frage nachzugehen, bedarf es weiterführender Untersuchungen.

4.7 Einfluss des *FTO-Knock-Downs* auf m⁶A

Der *FTO-Knock-Down* war hauptsächlich im Zellkern ausgeprägt (s. Abbildung 3G). Daher ist davon auszugehen, dass dieser vor allem die nukleären Funktionen von *FTO* beeinträchtigt hat und weniger die zytoplasmatischen. Zu diesen nukleären Funktionen gehört die posttranskriptionale Demethylierung von m⁶A (Wei et al. 2018; Yang et al. 2018; Zaccara et al. 2019). Infolgedessen ist anzunehmen, dass durch den Mangel an *FTO* eine Hypermethylierung von mRNAs entsteht. Diese Annahme wird auch durch frühere Studien unterstützt, die zeigten, dass der *knock down* von *FTO* zu einer signifikanten

Zunahme von m⁶A in RNA führt. Jia et al. (2011) zeigten dies für mRNA in HeLa(= Henrietta Lacks)- und HEK293-Zellen (= *human embryonic kidney 293* Zellen, deutsch: menschliche-embryonale-Nieren-293-Zellen) und Mathiyalagan et al. (2019) für die Gesamt-RNA in primären Ratten-Kardiomyozyten. Um zu untersuchen, ob der FTO-*Knock-Down* auch in den hiPSC-CMs zu einer Zunahme von m⁶A führt, wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt. In dieser war keine sichtbare Zunahme von m⁶A zu erkennen (s. Abbildung 8). Dies ist vermutlich der Tatsache geschuldet, dass keine quantifizierende Methode verwendet wurde und die m⁶A-Zunahme zu gering war, um sie rein optisch zu erkennen. Leider war eine immunzytochemische Methode zur Quantifizierung des m⁶A-Levels nicht möglich, da hierfür keine ausreichende Menge an RNA zur Verfügung stand. Da eine m⁶A-Zunahme optisch nicht erkannt werden konnte, scheint der Hypermethylierungseffekt der mRNA weniger ausgeprägt zu sein. Vermutlich ist aber auch nicht die Hypermethylierung an sich, sondern vielmehr ein verändertes m⁶A-Methylierungsmuster bzw. die mangelnde Demethylierung ganz bestimmter m⁶A-Stellen für die beobachtete Abschwächung der ET-1-Antwort durch den FTO-*Knock-Down* verantwortlich. Diese Annahme wird durch die Tatsache unterstützt, dass für die m⁶A-Modifikation eine Ortsspezifität besteht (Zaccara et al. 2019).

Bei der m⁶A-Modifikation handelt es sich vermutlich um einen eigenständigen mRNA-Regulationsmechanismus, der dafür verantwortlich zu sein scheint, dass sich Transkript- und Proteinspiegel (Su et al. 2015) sowie zytosolische und nukleäre mRNA-Spiegel (Preissl et al. 2015) nicht gleichen, indem er mRNA-Eigenschaften und -Prozesse reguliert. Zu diesen gehören die Stabilität, die Struktur, die prä-mRNA-Prozessierung, der Export und die Translation (Yang et al. 2018; Zaccara et al. 2019). Daher ist davon auszugehen, dass eine oder mehrere dieser Eigenschaften bzw. Prozesse durch den FTO-*Knock-Down* beeinflusst werden und darin die Ursache für die Abschwächung der ET-1-Antwort liegt.

Da die m⁶A-Demethylierung posttranskriptional stattfindet (Zaccara et al. 2019) und das m⁶A-Muster reifer mRNAs nicht mehr verändert wird (Ke et al. 2017), ist davon auszugehen, dass nur neu exprimierte mRNAs und deren Proteine vom FTO-*Knock-Down* beeinflusst werden. Der in dieser Arbeit gewählte Zeitraum von der siRNA-Transfektion bis zur Ernte der Zellen betrug maximal nur 96 Stunden. In dieser kurzen Zeit wurden vermutlich nur die durch ET-1 induzierbaren mRNAs vermehrt transkribiert.

Das würde erklären, warum sich die Menge des ERK1/2-Proteins durch den FTO-Mangel unverändert zeigt, aber die Kardiomyozyten-Hypertrophie verhindert und die ANP-Produktion abgeschwächt wird. Denn während die Genexpression von ANP und muskelspezifischen, prohypertrophen Transkripten durch ET-1 gesteigert wird, ist kein Effekt auf die Expression von ERK1/2 bekannt (Ito et al. 1991; Miyauchi und Masaki 1999; Archer et al. 2017; Miyauchi und Sakai 2019). Würde man den FTO-*Knock-Down* über einen deutlich längeren Zeitraum als 96 Stunden aufrechterhalten, wäre es möglich, dass nach und nach auch andere Proteine der Herzmuskelzellen verringert synthetisiert oder anderweitig beeinflusst würden. Die Überprüfung dieser These könnte ein interessantes Thema für zukünftige Studien sein.

4.8 Vergleich mit anderen Studien

Bisher gibt es nur wenige Studien, die sich mit der Rolle von m⁶A und seinen Regulatoren bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz beschäftigt haben. Berulava et. al untersuchten den Zusammenhang von m⁶A und Herzinsuffizienz anhand von Proben aus gesunden und aus versagenden Herzen sowie anhand eines Mausmodells, bei dem durch Drucküberlastung zunächst eine kompensierte Hypertrophie und schließlich eine dekomensierte Herzinsuffizienz entstand. Sie stellten fest, dass es mehr Transkripte mit einer veränderten m⁶A-Methylierung gab als Transkripte mit einer Expressionsänderung. Zudem gab es zwischen diesen zwei Gruppen kaum Überschneidungen, was darauf hindeutet, dass es sich bei der m⁶A-Modifikation um einen eigenständigen Regulationsmechanismus handelt, der größtenteils unabhängig von Transkriptionsänderungen ist. Von den Transkripten, welche bei Herzinsuffizienz im Vergleich zum gesunden Herzen eine veränderte m⁶A-Methylierung aufwiesen, war ein Teil hypermethyliert und der andere etwas größere Teil hypomethyliert. Die hypomethylierten Transkripte wurden u. a. mit der zellulären Antwort auf Stress in Verbindung gebracht (Berulava et al. 2020). Diese Beobachtung passt zu der in dieser Arbeit festgestellten Abschwächung der zellulären Antwort auf ET-1 durch einen FTO-Mangel, da durch diesen Transkripte nicht mehr ausreichend demethyliert werden können. Infolgedessen könnte die Entstehung hypomethylierter Transkripte beeinträchtigt sein, was die zelluläre Antwort auf Stressreize, wie ET-1, stören würde. Berulava et. al fanden zudem heraus, dass eine veränderte m⁶A-Methylierung transkriptionsunabhängig Einfluss auf das Proteinlevel hat. Als Ursache dafür legten die Daten eine veränderte Polysomenbindung und damit eine Beeinflussung der Translation

nahe, während sie eine Beeinflussung der mRNA-Stabilität unwahrscheinlich machten (Berulava et al. 2020). Folglich könnte als Ursache für die Verhinderung der Hypertrophie und Abschwächung der ANP-Synthese durch den FTO-*Knock-Down* in den hiPSC-CMs eine Hemmung der Translation durch bestimmte m⁶A-Stellen bzw. durch ein verändertes m⁶A-Muster der Transkripte in Frage kommen. Neben einer Beeinflussung der Translation schlugen Beruvala et al. (2020) eine Beeinflussung der Genexpressionsregulation durch m⁶A vor, da bei der Herzinsuffizienz u. a. auch mRNAs von Transkriptionsfaktoren verändert methyliert waren. Allerdings kommt eine Beeinflussung der Genexpressionsregulation als Ursache für die in dieser Arbeit beobachtete Abschwächung der hypertrophen Antwort durch den FTO-*Knock-Down* weniger in Betracht, da es sich um einen recht kurzen Beobachtungszeitraum handelte, in dem der Umsatz von Transkriptionsfaktoren wahrscheinlich nicht so hoch war. Daher wurden vermutlich auch die Proteinlevel der Transkriptionsfaktoren wenig bis gar nicht beeinflusst. Interessanterweise fanden Berulava et. al (2020) außerdem heraus, dass bei Mäusen mit kardialem FTO-*Knock-Out* (deutsch: Löschung) das Stadium der kompensierten Hypertrophie übersprungen wird und die Tiere als Reaktion auf eine Drucküberlastung direkt eine dekompenzierte Herzinsuffizienz entwickeln. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein, da der FTO-*Knock-Down* in den hiPSC-CMs ebenfalls eine Hypertrophie verhinderte. Anhand des hiPSC-CM-in-vitro-Modells können jedoch keine Aussagen über die funktionellen Auswirkungen der mangelnden Hypertrophie-Entwicklung getroffen werden. Das Mausmodell von Berulava et. al (2020) legt aber nahe, dass ein einfaches Ausschalten des FTO-Proteins und die daraus resultierende Unterbindung einer (zunächst) kompensierenden Hypertrophie die Entstehung einer Herzinsuffizienz nicht verhindern kann und die kardiale Funktion sogar verschlechtert.

Mathiyalagan et al. (2019) untersuchten die Rolle von m⁶A und seiner Demethylase FTO bei der Entstehung einer ischämisch bedingten Herzinsuffizienz. Dazu analysierten sie Proben aus gesunden und aus versagenden Herzen von Menschen, von Mäusen und von Schweinen. Sie stellten erhöhte m⁶A-Spiegel in der Gesamt-RNA und der mRNA bei ischämisch bedingter Herzinsuffizienz fest. Allerdings war der m⁶A-Anstieg in den versagenden Herzen auf die Infarkt- und Periinfarktregion beschränkt. Das erhöhte m⁶A-Level brachten sie mit einem erniedrigten FTO-Spiegel in Zusammenhang. Unterstützend konnten sie auch in einem Kardiomyozyten-Zellkulturmodell zeigen, dass eine Hypoxie

zu einem erniedrigten FTO- und einem erhöhten m⁶A-Spiegel führt. Dieser Effekt war Kardiomyozyten-spezifisch und trat nicht bei Nicht-Myozyten auf (Mathiyalagan et al. 2019). Mathiyalagan et al. (2019) stellten bei Herzinsuffizienz also eine Hypermethylierung von mRNA fest, während Berulava et al. (2020) sowohl Hyper- als auch Hypomethylierung von Transkripten fanden. Diese Diskrepanz könnte dadurch bedingt sein, dass Mathiyalagan et al. (2019) nur die ischämisch bedingte Herzinsuffizienz untersuchten und zudem den Gesamt-m⁶A-Spiegel und nicht den einzelner Transkripte betrachteten. Darüber hinaus stellten Mathiyalagan et al. fest, dass eine Überexpression von FTO die hypoxisch-bedingte Steigerung des m⁶A-Spiegels aufhebt und entstandene Kardiomyozyten-Dysfunktionen und das kardiale *Remodeling* abschwächt. Im Gegensatz dazu führte ein FTO-*Knock-Down* vermehrt zu Arrhythmien (Mathiyalagan et al. 2019). Folglich stellten auch Mathiyalagan et al. (2019) wie Berulava et al. (2020) fest, dass eine FTO-Defizienz nicht kardioprotektiv ist und sogar zu einer Verschlechterung der Herzfunktion führt. Eine FTO-Überexpression scheint hingegen unter bestimmten Bedingungen herzprotektiv zu sein. Des Weiteren legten die Daten von Mathiyalagan et al. nahe, dass FTO selektiv eine Untergruppe von mRNAs demethyliert, die u. a. mit Hypertrophie, Muskelkontraktion und Sarkomerorganisation assoziiert sind. Zudem stellte die Arbeitsgruppe einen Zusammenhang zwischen der Demethylierung dieser Transkripte und einer Erhöhung der mRNA-Stabilität fest (Mathiyalagan et al. 2019). Aufgrund dieser Beobachtungen wäre es möglich, dass der in dieser Arbeit untersuchte FTO-Mangel in den hiPSC-CMs zu einer verringerten mRNA-Stabilität von prohypertrophen Transkripten führt. Eine verringerte mRNA-Stabilität würde zu erniedrigten Proteinspiegeln der betroffenen Transkripte führen und kommt daher als mögliche Ursache für die Unterbindung der Hypertrophie und die Abschwächung der ANP-Synthese in Frage.

Shen et al. untersuchten ebenfalls die Rolle von m⁶A und seiner Demethylase FTO bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz. Dazu nutzen sie ein Mausmodell, bei dem entweder durch Drucküberlastung oder durch Doxorubicin eine Herzinsuffizienz erzeugt wurde, sowie ein Kardiomyozyten-Zellkulturmodell mit FTO-Überexpression oder *-Knock-Down*, das einer Hypoxie und Reoxygenierung ausgesetzt wurde. Sie fanden heraus, dass bei Herzinsuffizienz der m⁶A-Spiegel in RNA erhöht ist und FTO sowohl auf der mRNA- als auch auf der Protein-Ebene herunterreguliert ist. Darüber hinaus hemmte eine FTO-Überexpression die Apoptose von mit Hypoxie/Reoxygenierung

behandelten Kardiomyozyten, während ein *FTO-Knock-Down* die Apoptose verstärkte (Shen et al. 2021). Diese Beobachtungen unterstützen zusammen mit den Ergebnissen von Mathiyalagan et al. (2019) und Berulava et al. (2020) die These, dass eine *FTO*-Defizienz nicht kardioprotektiv ist, eine *FTO*-Überexpression hingegen schon. Die von Shen et al. festgestellte Erhöhung des m^6A - und Verringerung des *FTO*-Spiegels bei Herzinsuffizienz stimmt mit den Ergebnissen von Mathiyalagan et al. (2019) überein, während Berulava et al. (2020) keine Veränderung des *FTO*-Spiegels und sowohl Hyper- als auch Hypomethylierung von Transkripten fanden, obwohl die Arbeitsgruppe ebenfalls ein Mausmodell mit drucküberlastungsinduzierter Herzinsuffizienz nutzte. Um diese Diskrepanz zu klären, bedarf es weiterer Untersuchungen.

Dorn et al. haben die Rolle von m^6A und seiner Methyltransferase *METTL3* bei der Entstehung einer Hypertrophie und Herzinsuffizienz untersucht. Dazu nutzten sie ein Ratten-Kardiomyozyten-Zellkulturmodell mit *METTL3*-Überexpression oder -Mangel und ein Mausmodell mit *METTL3*-Überexpression oder -Löschung. Als prohypertropher Stimulus wurde Serum oder eine Drucküberlastung verwendet. Sie entdeckten einen Anstieg des globalen m^6A -Spiegels und 713 verändert methylierte mRNAs bei Hypertrophie. Zudem fanden sie heraus, dass eine Überexpression von *METTL3* zu einem m^6A -Anstieg und zu einer physiologischen Kardiomyozyten-Hypertrophie mit erhaltener Herzfunktion führt. Unter Drucküberlastung verschlechterte die *METTL3*-Überexpression die kardiale Dysfunktion und die hypertrophe Antwort nicht, verbesserte sie aber auch nicht. Ein *METTL3-Knock-Down* hingegen hatte keinen Einfluss auf die basale Zellgröße, aber verhinderte die Entstehung einer Hypertrophie durch Stressstimulation. Bei Mäusen führte die kardiale Löschung von *METTL3* zu einem erniedrigten m^6A -Spiegel. Die Herzentwicklung blieb durch den *METTL3-Knock-Out* unbeeinträchtigt; mit steigendem Alter entwickelten die Mäuse allerdings eine ventrikuläre Dilatation und Abnahme der Herzfunktion. Unter Drucküberlastung beschleunigte der *METTL3-Knock-Out* die Progression einer Herzinsuffizienz (Dorn et al. 2019). Diese Ergebnisse ähneln denen dieser Arbeit sowie denen von Berulava et al. (2020), Mathiyalagan et al. (2019) und Shen et al. (2021). Dorn et al. (2019) zeigten, dass eine *METTL3*-Defizienz eine Hypertrophie zwar verhindert, aber zu einer Dilatation und Verschlechterung der Herzfunktion führt. Die Untersuchungen dieser Arbeit kamen zusammen mit denen von Berulava et al. (2020) zu genau dem gleichen Ergebnis für die Demethylase *FTO*. Zusammengenommen lässt sich daraus schließen, dass sowohl

METTL3 als auch FTO für die Entstehung einer konzentrischen Hypertrophie als zunächst kompensatorische Antwort auf Stressstimulation von entscheidender Bedeutung ist. METTL3 und FTO scheinen gemeinsam das m⁶A-Muster bestimmter mRNAs zu formen. In der Folge ist von der Entstehung eines falschen m⁶A-Methylierungsmusters sowohl beim Fehlen von FTO als auch beim Fehlen von METTL3 auszugehen. Das falsche Muster führt vermutlich zu einer Beeinträchtigung der mRNA-Stabilität und/oder der Translation, möglicherweise auch der mRNA-Struktur, der prä-mRNA-Prozessierung oder des mRNA-Exports. Diese Beeinträchtigung wiederum führt vermutlich dazu, dass die Proteine der betroffenen Transkripte nicht mehr ausreichend gebildet werden können. Dies könnte die Verhinderung einer Hypertrophie sowohl durch einen FTO- als auch durch einen METTL3-Mangel erklären. Des Weiteren fanden Mathiyalagan et al. (2019), Shen et al. (2021) und Dorn et al. (2019) heraus, dass eine Überexpression von METTL3 oder FTO im Gegensatz zu deren Mangel einen eher kardioprotektiven Effekt hat. Auch diese Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit beider m⁶A-Regulatoren bei der Antwort auf kardialen Stress. Insgesamt deuten die Beobachtungen dieser Arbeit in Zusammenschau mit anderen Studien darauf hin, dass eine Dysregulation von FTO und METTL3 an der Entstehung einer Herzinsuffizienz beteiligt ist.

Bartosovic et al. untersuchten die Auswirkungen eines *FTO-Knock-Outs* in HEK293-Zellen. Sie entdeckten, dass ein *FTO-Knock-Out* zum *Exon-Skipping* (deutsch: Überspringen) und zur Hochregulation von terminalen Exons führt. Zudem legten die Daten nahe, dass die Effekte des *FTO-Knock-Outs* über m⁶A vermittelt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass FTO über die Demethylierung von m⁶A das alternative Spleißen und die 3'UTR-Prozessierung von mRNAs reguliert und den Exon-Einschluss fördert (Bartosovic et al. 2017). Daher kommt eine Beeinträchtigung der prä-mRNA-Prozessierung ebenfalls als Ursache für die in dieser Arbeit beobachtete Abschwächung der ET-1-Antwort durch den *FTO-Knock-Down* in Betracht. Allerdings muss erwähnt werden, dass die Beeinflussung der prä-mRNA-Prozessierung durch FTO nur in HEK-Zellen und nicht in Kardiomyozyten gezeigt wurde. Darüber hinaus stellten Bartosovic et al. (2017) fest, dass *FTO-Knock-Out-Zellen* im Vergleich zu Kontrollzellen eine verringerte Proliferation zeigen. Diese Beobachtung ähnelt der in dieser Arbeit festgestellten Verhinderung einer Hypertrophie und Verringerung der Zellgröße (bei der Zelllinie WT-D2-1u) durch einen FTO-Mangel.

4.9 Einfluss des FTO-*Knock-Downs* auf m⁶A_m

Da FTO auch eine beachtliche Demethylaseaktivität gegenüber m⁶A_m besitzt (Mauer et al. 2017; Wei et al. 2018), könnten die Auswirkungen des *knock downs* z. T. auch durch die mangelnde Demethylierung des Cap-m⁶A_m der mRNAs bedingt sein. Die Erhöhung der Transkript-Stabilität ist bisher die einzig bekannte Funktion von m⁶A_m in mRNAs (Mauer et al. 2017). Folglich reduziert die Demethylierung der Modifikation durch FTO die Stabilität der betroffenen Transkripte. Schlussfolgernd ist anzunehmen, dass der FTO-*Knock-Down* durch eine verringerte Demethylierung von m⁶A_m zu einer Erhöhung der mRNA-Stabilität aller m⁶A_m-enthaltenden Transkripte führt. Infolgedessen ist es unwahrscheinlich, dass die Abschwächung der hypertrophen Antwort der hiPSC-CMs durch die mangelnde Demethylierung von m⁶A_m bedingt ist, da man in diesem Fall durch die erhöhte mRNA-Stabilität eher eine verstärkte hypertrophe Antwort erwarten würde. Zudem findet die Demethylierung von Cap-m⁶A_m durch FTO vorzugsweise im Zytoplasma statt, während die von m⁶A im Zellkern stattfindet (Wei et al. 2018). Da der FTO-Mangel hauptsächlich im Zellkern ausgeprägt war (s. Abbildung 3G), befürwortet dies ebenfalls die Annahme, dass die Abschwächung der ET-1-Antwort durch den FTO-*Knock-Down* durch m⁶A und nicht durch m⁶A_m vermittelt wird. Allerdings demethyliert FTO auch m⁶A_m in snRNA (Wei et al. 2018). Mauer et al. (2019) zeigten, dass die Hemmung von FTO zu einem erhöhten m⁶A_m-Level in snRNA und zu verändertem alternativen Spleißen führt. Da snRNAs bekanntermaßen an der Regulation des Spleißens beteiligt sind (Yan et al. 2019), wäre es möglich, dass die Effekte des FTO-Mangels teilweise auch indirekt über eine Beeinflussung des Spleißens durch m⁶A_m-snRNAs zustande kommen. Um abschließend zu klären, ob m⁶A_m ebenfalls eine Rolle bei der Vermittlung der FTO-*Knock-Down*-Auswirkungen spielt oder nicht, bedarf es weiterer Untersuchungen.

4.10 Einfluss der FTO-Expression auf die Expression anderer m⁶A-Regulatoren

Es ist denkbar, dass ein *knock down* oder eine Überexpression von FTO Einfluss auf die Expression anderer m⁶A-Regulatoren hat. Dieser mögliche Einfluss wurde von Mathiyalagan et al. (2019) und Jia et al. (2011) untersucht. Während Mathiyalagan et al. (2019) keinen Einfluss einer FTO-Überexpression auf die Expression anderer m⁶A-Regulatoren fanden, beobachteten Jia et al. (2011) bei einer FTO-Überexpression eine Zunahme von METTL3 um 15 % und umgekehrt bei einem FTO-*Knock-Down* eine

Abnahme von METTL3 um 15 %. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass der Einfluss der FTO-Expression auf das Level der anderen m⁶A-Regulatoren eher gering ist. Daher ist anzunehmen, dass die Auswirkungen eines FTO-*Knock-Downs* direkt auf den FTO-Mangel zurückgeführt werden können.

4.11 FTO und ALKBH5

Neben FTO existiert noch eine andere m⁶A-Demethylase namens ALKBH5 (Yang et al. 2018; Zaccara et al. 2019). Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, kann ALKBH5 den Ausfall von FTO jedoch nicht kompensieren. Folglich sind ALKBH5 und FTO vermutlich für unterschiedliche m⁶A-Methylierungsstellen und unterschiedliche Aufgaben in der Zelle zuständig.

4.12 METTL3- und FTO-Expression bei Herzinsuffizienz

Das Hinzufügen und Entfernen der m⁶A-Modifikation wird bekanntermaßen dynamisch durch METTL3 und FTO reguliert (Yang et al. 2018; Zaccara et al. 2019). Wie aber die Expression und Aktivität von METTL3 und FTO reguliert werden und wie genau sie ihre Ziel-Transkripte und -m⁶A-Stellen auswählen, ist noch nicht bekannt. Berulava et al. (2020) untersuchten, ob sich die Transkript- oder Proteinspiegel von METTL3 und FTO bei Herzinsuffizienz verändern, konnten aber keine Veränderungen feststellen. In dieser Arbeit konnte unter Stressstimulation (mit ET-1) ebenfalls keine Veränderung des FTO-Spiegels festgestellt werden (s. Abbildung 4). Im Gegensatz dazu stellten Mathiyalagan et al. (2019) und Shen et al. (2021) einen erniedrigten FTO-Transkript- und -Proteinspiegel bei Herzinsuffizienz fest. Die Diskrepanz der Beobachtungen könnte sich durch den jeweils gewählten Fokus erklären. Während Mathiyalagan et al. (2019) die ischämisch bedingte Herzinsuffizienz untersuchten, konzentrierten sich Berulava et al. (2020) auf Herzinsuffizienz, die durch Drucküberlastung entstanden ist. Allerdings untersuchten Shen et al. (2021) ebenfalls die drucküberlastungsinduzierte Herzinsuffizienz. Zur Klärung dieser Diskrepanz bedarf es weiterer Untersuchungen. Die Herunterregulation von FTO unter hypoxischen Bedingungen könnte damit zusammenhängen, dass dessen enzymatische Aktivität sauerstoffabhängig ist (Gerken et al. 2007). Mathiyalagan et al. (2019) schlugen als Ursache für den FTO-Mangel hypoxieinduzierbare miRNAs vor. Insgesamt deuten die Ergebnisse der bisherigen Studien darauf hin, dass FTO und METTL3 nicht nur über ihr Proteinlevel reguliert

werden und ihre Regulation kontextabhängig ist. Daher muss es noch andere Regulationsmechanismen geben, die bisher unentdeckt blieben.

4.13 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit und den Erkenntnissen aus anderen Studien schlussfolgern, dass sowohl FTO als auch METTL3 eine entscheidende Rolle bei der Antwort auf kardialen Stress spielen. Beide sind maßgeblich an der Entstehung einer konzentrischen Hypertrophie beteiligt. Ein *knock down* oder *knock out* einer dieser beiden m⁶A-Regulatoren verhindert zwar die Entstehung einer Hypertrophie, führt aber trotzdem zu einer Herzinsuffizienz mit ventrikulärer Dilatation (exzentrische Hypertrophie) und zur Abnahme der Herzfunktion. Dabei wird die Progression der Herzinsuffizienz sogar beschleunigt, weil das Stadium der (zunächst) kompensatorischen konzentrischen Hypertrophie übersprungen wird. Eine FTO- oder METTL3-Überexpression scheint hingegen tendenziell kardioprotektiv zu sein und kardiale Dysfunktionen sowie den kardialen Umbau abzuschwächen. Diese Erkenntnisse weisen auf eine Schlüsselrolle von FTO und METTL3 im Herzen hin.

Bisherige Beobachtungen deuten stark darauf hin, dass die Auswirkungen eines Mangels oder Überangebots von FTO oder METTL3 über m⁶A vermittelt sind. Dabei scheint nicht nur die entstehende Hyper- oder Hypomethylierung an sich von Bedeutung zu sein, sondern vor allem das veränderte Methylierungsmuster, da die jeweilige Funktion von m⁶A vermutlich über bestimmte Stellen und das spezifische Muster der Modifikation bestimmt wird. Durch die veränderten m⁶A-Muster der Transkripte scheinen verschiedene mRNA-Eigenschaften und -Vorgänge beeinflusst zu werden, zu denen die Stabilität, die Translation und die prä-mRNA-Prozessierung gehören. Darüber hinaus wäre eine Beeinflussung des mRNA-Exports oder der -Struktur denkbar.

Im Falle der ET-1-Stimulation der hiPSC-CMs wurde das m⁶A-Muster der neu transkribierten mRNAs durch den FTO-*Knock-Down* abgeändert. Daher haben sich auch die Auswirkungen des Musters verändert, was zu einer verringerten Proteinsynthese führte. Herauszufinden, welche mRNA-Eigenschaft oder welcher -Prozess in diesem konkreten Fall durch das neue m⁶A-Muster beeinträchtigt wurde, könnte Inhalt zukünftiger Studien sein.

Da noch nicht bekannt, ist wie die Expression und Aktivität von METTL3 und FTO reguliert werden und wie genau sie ihre Ziel-Transkripte und -m⁶A-Stellen auswählen, könnte auch dies ein Thema für zukünftige Untersuchungen sein. Aus den bisherigen Beobachtungen scheint sich aber abzuzeichnen, dass die FTO- und METTL3-Regulation zelltypen- und kontextabhängig sowie krankheitsspezifisch ist. Im Falle der Herzinsuffizienz könnte ein kontrolliertes Eingreifen in die FTO- oder METTL3-Regulation neue Therapiemöglichkeiten eröffnen. Ein einfaches Ausschalten des FTO- oder METTL3-Proteins scheint aber keine geeignete Lösung zu sein. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine Überexpression dieser Proteine als vielversprechender Ansatz.

Insgesamt deuten die bisherigen Erkenntnisse darauf hin, dass FTO und METTL3 gemeinsam das m⁶A-Muster regulieren und über diese Funktion an der Regulation des kardialen Umbaus und an der Steuerung der Herzfunktion beteiligt sind.

5 Zusammenfassung

Die Herzinsuffizienz ist eine häufige Erkrankung mit steigender Prävalenz. Die Krankheit beeinträchtigt die Lebensqualität erheblich, zudem sind Mortalität und Morbidität hoch. Die bisherigen Therapien können die Progression der Erkrankung nicht aufhalten. Daher werden dringend neue und effektivere Therapiemöglichkeiten benötigt. Als Zwischenschritt auf dem Weg zu einer Herzinsuffizienz findet sich häufig eine pathologische Herzhypertrophie. Bei der Entstehung einer pathologischen Hypertrophie bis hin zu einer Herzinsuffizienz kommt es zu molekularen, zellulären und interstitiellen Umbauprozessen, die als kardiales *Remodeling* bezeichnet werden. Dabei spielen auch epigenetische Veränderungen eine Rolle. Zu diesen epigenetischen Veränderungen zählen u. a. veränderte posttranskriptionale Modifikationen von RNAs. Eine dieser Modifikationen ist die Methylierung von Adenosin am Stickstoff an Position 6, kurz m⁶A. N6-Methyladenosin ist die häufigste Modifikation in mRNAs. Die Bildung von m⁶A wird durch die Methyltransferase METTL3 katalysiert. Für das Entfernen der Modifikation ist dagegen die Demethylase FTO zuständig. Zudem gibt es noch verschiedene Bindungsproteine von m⁶A, die z. T. die Funktionen der Modifikation vermitteln. Zu den Funktionen von m⁶A gehört die Beeinflussung der prä-mRNA-Prozessierung, des mRNA-Exports, der mRNA-Stabilität, der mRNA-Struktur und der Translation. In den letzten Jahren wurde zunehmend festgestellt, dass m⁶A eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz spielt.

Daher war es Ziel dieser Arbeit, näher zu ergründen, welche Rolle die mRNA-Modifikation m⁶A und ihre Demethylase FTO bei der Entwicklung einer Hypertrophie bis hin zu einer Herzinsuffizienz spielen. Um diese Frage zu beantworten, wurden die Auswirkungen eines *FTO-Knock-Downs* auf eine durch Endothelin-1 induzierte Hypertrophie in einem Kardiomyozyten-Zellkulturmodell untersucht. Dazu wurden die Kardiomyozyten zunächst aus Stammzellen ausdifferenziert. Anschließend wurde in den Herzmuskelzellen ein *FTO-Knock-Down* etabliert. In einem nächsten Schritt wurde der *FTO-Knock-Down* dann mit einer Endothelin-1-Behandlung kombiniert und dessen Auswirkungen auf die hypertrophe Antwort der Zellen per Western Blot und Immunfluoreszenz-Färbung untersucht. Dabei zeigte sich, dass der *FTO-Knock-Down* die hypertrophe Antwort der Kardiomyozyten abschwächt. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Menge des ERK1/2-Proteins, ein Protein eines Endothelin-1-induzierten Signalwegs,

durch den FTO-Mangel nicht verändert wird. Außerdem hatte die Endothelin-1-Stimulation keinen Einfluss auf die Menge des FTO-Proteins.

Zusammenfassend legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass FTO eine entscheidende Rolle bei der Antwort auf kardialen Stress spielt. Das Protein ist maßgeblich an der Entstehung einer (konzentrischen) Hypertrophie beteiligt. Ein FTO-Mangel verhindert eine Kardiomyozyten-Hypertrophie. Diese Auswirkung des Mangels scheint über m⁶A vermittelt zu sein. Hingegen scheint eine Beeinträchtigung des durch Endothelin-1 aktivierten ERK1/2-Signalwegs keine Rolle zu spielen. Durch den FTO-Mangel entstehen vermutlich eine m⁶A-Hypermethylierung und v. a. ein verändertes m⁶A-Methylierungsmuster. Infolgedessen werden wahrscheinlich die prä-mRNA-Prozessierung, der mRNA-Export, die mRNA-Stabilität, die mRNA-Struktur oder die Translation beeinträchtigt. Dies könnte die mangelnde Synthese der hypertrophen Proteine und damit die Abschwächung der hypertrophen Antwort der Herzmuskelzellen erklären.

Insgesamt deuten die Erkenntnisse dieser Arbeit darauf hin, dass FTO an der Regulation des kardialen Umbaus beteiligt ist. Daher könnte ein kontrolliertes Eingreifen in die FTO-Regulation zukünftig neue Therapiemöglichkeiten für die Herzinsuffizienz eröffnen.

6 Literaturverzeichnis

Archer CR, Robinson EL, Drawnel FM, Roderick HL (2017): Endothelin-1 promotes hypertrophic remodelling of cardiac myocytes by activating sustained signalling and transcription downstream of endothelin type A receptors. *Cell Signal* 36, 240–254

Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SAR, Zornoff LAM (2015): Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol* 106, 62–69

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

Berezin A (2016): Epigenetics in heart failure phenotypes. *BBA Clin* 6, 31–37

Berulava T, Buchholz E, Elerdashvili V, Pena T, Islam MR, Lbik D, Mohamed BA, Renner A, Lewinski D von, Sacherer M, et al. (2020): Changes in m6A RNA methylation contribute to heart failure progression by modulating translation. *Eur J Heart Fail* 22, 54–66

Boissel S, Reish O, Proulx K, Kawagoe-Takaki H, Sedgwick B, Yeo GSH, Meyre D, Golzio C, Molinari F, Kadhom N, et al. (2009): Loss-of-Function Mutation in the Dioxygenase-Encoding FTO Gene Causes Severe Growth Retardation and Multiple Malformations. *Am J Hum Genet* 85, 106–111

Carthew RW, Sontheimer EJ (2009): Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642–655

Chatterjee K (2012): Pathophysiology of Systolic and Diastolic Heart Failure. *Med Clin North Am* 96, 891–899

- Devaux Y, Nossent AY (2020): A role for m6A RNA methylation in heart failure development? *Eur J Heart Fail* 22, 67–69
- Dorn LE, Lasman L, Chen J, Xu X, Hund TJ, Medvedovic M, Hanna JH, van Berlo JH, Accornero F (2019): The N6-Methyladenosine mRNA Methylase METTL3 Controls Cardiac Homeostasis and Hypertrophy. *Circulation* 139, 533–545
- Fischer J, Koch L, Emmerling C, Vierkotten J, Peters T, Brüning JC, Rütger U (2009): Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature* 458, 894–898
- Fu S, Ping P, Wang F, Luo L (2018): Synthesis, secretion, function, metabolism and application of natriuretic peptides in heart failure. *J Biol Eng* 12, 2
- Fu Y, Jia G, Pang X, Wang RN, Wang X, Li CJ, Smemo S, Dai Q, Bailey KA, Nobrega MA, et al. (2013): FTO-mediated formation of N 6 -hydroxymethyladenosine and N 6 -formyladenosine in mammalian RNA. *Nat Commun* 4, 1798
- Fu Y, Dominissini D, Rechavi G, He C (2014): Gene expression regulation mediated through reversible m6A RNA methylation. *Nat Rev Genet* 15, 293–306
- Gerken T, Girard CA, Tung YCL, Webby CJ, Saudek V, Hewitson KS, Yeo GSH, McDonough MA, Cunliffe S, McNeill LA, et al. (2007): The Obesity-Associated FTO Gene Encodes a 2-Oxoglutarate-Dependent Nucleic Acid Demethylase. *Science* 318, 1469–1472
- Gulati P, Avezov E, Ma M, Antrobus R, Lehner P, O’Rahilly S, Yeo GSH (2014): Fat mass and obesity-related (FTO) shuttles between the nucleus and cytoplasm. *Biosci Rep* 34, e00144
- Hannan RD, Jenkins A, Jenkins AK, Brandenburger Y (2003): Cardiac hypertrophy: A matter of translation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30, 517–527

- Ito H, Hirata Y, Hiroe M, Tsujino M, Adachi S, Takamoto T, Nitta M, Taniguchi K, Marumo F (1991): Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 69, 209–215
- Jia G, Yang CG, Yang S, Jian X, Yi C, Zhou Z, He C (2008): Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human FTO. *FEBS Lett* 582, 3313–3319
- Jia G, Fu Y, Zhao X, Dai Q, Zheng G, Yang Y, Yi C, Lindahl T, Pan T, Yang YG, He C (2011): N6-Methyladenosine in Nuclear RNA is a Major Substrate of the Obesity-Associated FTO. *Nat Chem Biol* 7, 885–887
- Ke S, Pandya-Jones A, Saito Y, Fak JJ, Vågbø CB, Geula S, Hanna JH, Black DL, Darnell JE, Darnell RB (2017): m6A mRNA modifications are deposited in nascent pre-mRNA and are not required for splicing but do specify cytoplasmic turnover. *Genes Dev* 31, 990–1006
- Kehat I, Molkentin JD (2010): Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling in cardiac hypertrophy. *Ann N Y Acad Sci* 1188, 96–102
- Kehat I, Davis J, Tiburcy M, Accornero F, Saba-El-Leil MK, Maillet M, York AJ, Lorenz JN, Zimmermann WH, Meloche S, Molkentin JD (2011): Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2 Regulate the Balance Between Eccentric and Concentric Cardiac Growth. *Circ Res* 108, 176–183
- Kitta K, Clément SA, Remeika J, Blumberg JB, Suzuki YJ (2001): Endothelin-1 induces phosphorylation of GATA-4 transcription factor in the HL-1 atrial-muscle cell line. *Biochem J* 359, 375–380
- Klein RM, MacGillivray BK, McKenzie JC (1995): Markers of cardiac hypertrophy. *Ann N Y Acad Sci* 752, 210–217

- Li CH, Tam PKS (1998): An iterative algorithm for minimum cross entropy thresholding. *Pattern Recognit Lett* 19, 771–776
- Lian X, Zhang J, Azarin SM, Zhu K, Hazeltine LB, Bao X, Hsiao C, Kamp TJ, Palecek SP (2013): Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc* 8, 162–175
- Liang Q, Wiese RJ, Bueno OF, Dai YS, Markham BE, Molkenin JD (2001): The Transcription Factor GATA4 Is Activated by Extracellular Signal-Regulated Kinase 1- and 2-Mediated Phosphorylation of Serine 105 in Cardiomyocytes. *Mol Cell Biol* 21, 7460–7469
- Lin S, Choe J, Du P, Triboulet R, Gregory RI (2016): The m(6)A Methyltransferase METTL3 Promotes Translation in Human Cancer Cells. *Mol Cell* 62, 335–345
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408
- Longenecker JZ, Gilbert CJ, Golubeva VA, Martens CR, Accornero F (2020): Epitranscriptomics in the Heart: a Focus on m6A. *Curr Heart Fail Rep* 17, 205–212
- Mathiyalagan P, Adamiak M, Mayourian J, Sassi Y, Liang Y, Agarwal N, Jha D, Zhang S, Kohlbrenner E, Chepurko E, et al. (2019): FTO-Dependent N6-Methyladenosine Regulates Cardiac Function During Remodeling and Repair. *Circulation* 139, 518–532
- Mauer J, Luo X, Blanjoie A, Jiao X, Grozhik AV, Patil DP, Linder B, Pickering BF, Vasseur JJ, Chen Q, et al. (2017): Reversible methylation of m6Am in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature* 541, 371–375
- Mauer J, Sindelar M, Despic V, Guez T, Hawley BR, Vasseur JJ, Rentmeister A, Gross SS, Pellizzoni L, Debart F, et al. (2019): FTO controls reversible m6Am RNA methylation during snRNA biogenesis. *Nat Chem Biol* 15, 340–347

Meyer KD, Patil DP, Zhou J, Zinoviev A, Skabkin MA, Elemento O, Pestova TV, Qian SB, Jaffrey SR (2015): 5' UTR m6A Promotes Cap-Independent Translation. *Cell* 163, 999–1010

Miyauchi T, Masaki T (1999): PATHOPHYSIOLOGY OF ENDOTHELIN IN THE CARDIOVASCULAR SYSTEM. *Annu Rev Physiol* 61, 391–415

Miyauchi T, Sakai S (2019): Endothelin and the heart in health and diseases. *Peptides* 111, 77–88

Morin S, Paradis P, Aries A, Nemer M (2001): Serum Response Factor-GATA Ternary Complex Required for Nuclear Signaling by a G-Protein-Coupled Receptor. *Mol Cell Biol* 21, 1036–1044

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

Peer E, Rechavi G, Dominissini D (2017): Epitranscriptomics: regulation of mRNA metabolism through modifications. *Curr Opin Chem Biol* 41, 93–98

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

Preissl S, Schwaderer M, Raulf A, Hesse M, Grüning BA, Köbele C, Backofen R, Fleischmann BK, Hein L, Gilsbach R (2015): Deciphering the Epigenetic Code of Cardiac Myocyte Transcription. *Circ Res* 117, 413–423

Purcell NH, Wilkins BJ, York A, Saba-El-Leil MK, Meloche S, Robbins J, Molkenin JD (2007): Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14074–14079

- Rajecka V, Skalicky T, Vanacova S (2019): The role of RNA adenosine demethylases in the control of gene expression. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* 1862, 343–355
- Savarese G, Lund LH (2017): Global Public Health Burden of Heart Failure. *Card Fail Rev* 3, 7–11
- Schramke V, Allshire R (2004): Those interfering little RNAs! Silencing and eliminating chromatin. *Curr Opin Genet Dev* 14, 174–180
- Shen W, Li H, Su H, Chen K, Yan J (2021): FTO overexpression inhibits apoptosis of hypoxia/reoxygenation-treated myocardial cells by regulating m6A modification of Mhrt. *Mol Cell Biochem* 476, 2171–2179
- Shimizu I, Minamino T (2016): Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 97, 245–262
- Shinozawa T, Imahashi K, Sawada H, Furukawa H, Takami K (2012): Determination of Appropriate Stage of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes for Drug Screening and Pharmacological Evaluation In Vitro. *J Biomol Screen* 17, 1192–1203
- Slobodin B, Han R, Calderone V, Vrielink JAFO, Loayza-Puch F, Elkon R, Agami R (2017): Transcription Impacts the Efficiency of mRNA Translation via Co-transcriptional N6-adenosine Methylation. *Cell* 169, 326–337.e12
- Streckfuss-Bömeke K, Wolf F, Azizian A, Stauske M, Tiburcy M, Wagner S, Hübscher D, Dressel R, Chen S, Jende J, et al. (2013): Comparative study of human-induced pluripotent stem cells derived from bone marrow cells, hair keratinocytes, and skin fibroblasts. *Eur Heart J* 34, 2618–2629

Su YR, Chiusa M, Brittain E, Hemnes AR, Absi TS, Lim CC, Di Salvo TG (2015): Right Ventricular Protein Expression Profile in End-Stage Heart Failure. *Pulm Circ* 5, 481–497

Temsah R, Nemer M (2005): GATA factors and transcriptional regulation of cardiac natriuretic peptide genes. *Regul Pept* 128, 177–185

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

Wang X, Zhao BS, Roundtree IA, Lu Z, Han D, Ma H, Weng X, Chen K, Shi H, He C (2015): N⁶-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency. *Cell* 161, 1388–1399

Wei C, Gershowitz A, Moss B (1975): N⁶, O^{2'}-dimethyladenosine a novel methylated ribonucleoside next to the 5' terminal of animal cell and virus mRNAs. *Nature* 257, 251–253

Wei J, Liu F, Lu Z, Fei Q, Ai Y, He PC, Shi H, Cui X, Su R, Klungland A, et al. (2018): Differential m⁶A, m⁶Am, and m¹A Demethylation Mediated by FTO in the Cell Nucleus and Cytoplasm. *Mol Cell* 71, 973–985.e5

Yan C, Wan R, Shi Y (2019): Molecular Mechanisms of pre-mRNA Splicing through Structural Biology of the Spliceosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11, a032409

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

Yuan K, Park BM, Choi YT, Kim JH, Cho KW, Kim SH (2016): Effects of endothelin family on ANP secretion. *Peptides* 82, 12–19

Yue TL, Gu JL, Wang C, Parsons AA, Ohlstein EH, Reith AD, Lee JC, Mirabile RC, Kreutz R, Wang Y, Maleeff B (2000): Extracellular Signal-regulated Kinase Plays an Essential Role in Hypertrophic Agonists, Endothelin-1 and Phenylephrine-induced Cardiomyocyte Hypertrophy. *J Biol Chem* 275, 37895–37901

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

Zhang X, Wei LH, Wang Y, Xiao Y, Liu J, Zhang W, Yan N, Amu G, Tang X, Zhang L, Jia G (2019): Structural insights into FTO's catalytic mechanism for the demethylation of multiple RNA substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 2919–2924

Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich bei meinem Doktorvater Karl für die Vergabe dieses spannenden Themas und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe sowie für die gute und freundliche Unterstützung während und nach meiner Zeit im Labor bedanken.

Großer Dank gilt auch meinem direkten Betreuer Eric für die tatkräftige und herzliche Unterstützung und Hilfe sowie für das Gegenlesen meiner Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Toischer für die Hilfe und die freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken.