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

Epigenetische Suppression von *RASAL1* und *ATP2A2* als Biomarker und Therapieansatz bei kardialer Fibrogenese

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Jonas Gosch

aus

Lübeck

Göttingen 2019

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Betreuungsausschuss

Betreuerin:	Prof. Dr. med. E. Zeisberg
Ko-Betreuer:	Prof. Dr. S. Johnsen

Prüfungskommission

Referentin:	Prof. Dr. med. E. Zeisberg
Ko-Referent:	Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. T. Klengel
Drittreferent:	Prof. Dr. rer. nat. T. Beißbarth

Datum der mündlichen Prüfung: 14.07.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Epigenetische Suppression von *RASAL1* und *ATP2A2* als Biomarker und Therapieansatz bei kardialer Fibrogenese" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Inhaltsverzeichnis

Abbi	Abbildungsverzeichnis III		
Tabe	TabellenverzeichnisIV		
Abki	ürzungsverzeichnis	V	
1	Einleitung	1	
1.1	Chronische Herzerkrankungen im 21. Jahrhundert	1	
1.2	Die Bedeutung der Herzfibrose	2	
1.3	Epigenetische Regulationsmechanismen	6	
1.4	RASAL1 im Fokus fibrotischer Pathophysiologie	7	
1.5	Therapie durch Demethylierung	9	
1.6	Die zentrale Rolle der Ca ²⁺ -Pumpe SERCA2	11	
1.7	Zielsetzung der vorliegenden Dissertation	14	
2	Material	16	
2.1	Geräte		
2.2	Software		
2.3	Gebrauchsmaterialien		
2.4	Kitsysteme		
2.5	Chemikalien, Reagenzien und Wirkstoffe		
2.6	Puffer und Lösungen		
2.7	Oligonukleotide (Primer)		
2.8	Antikörper		
2.9	Murines und humanes Untersuchungsmaterial		
3	Methoden	24	
3.1	Mausstudie		
3.2	Proteinbiologische Methoden		
3.3	Molekularbiologische Methoden		
3.4	Histologische Methoden		
3.5	Statistische Analysen	41	
4	Ergebnisse		
4.1	Etablierung des Mausmodells		
4.2	Repression von Rasal1 und Serca2 unter AT-II-Einfluss		
4.3	Der therapeutische Effekt von Hydralazin im epigenetischen Kontext	46	
4.4	Etablierung eines Biomarkers		
4.5	Etablierung des Biomarkers im Humanmodell		

5	Diskussion	55
5.1	Fibroseinduktion durch AT-II im 2- und 4-Wochen-Vergleich	55
5.2	Epigenetik und Expression von Rasal1	57
5.3	Serca2-Isoformen im Kontext kardialer Fibrose	58
5.4	" <i>Liquid Biopsy</i> " als Biomarker	59
5.5	Etablierung eines Herzfibrose-Biomarkers im Maus- und Humanmodell	60
5.6	HFpEF-Patienten als mögliche Zielgruppe	62
5.7	Therapie durch Hydralazin	63
6	Zusammenfassung	65
7	Anhang	67
8	Literaturverzeichnis	69
8.1	Zeitschriftenartikel	69
8.2	Internetquellen	81

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Herkunft von Myofibroblasten in fibrotischen Herzen	4
Abbildung 2: RAAS-Signalkaskade	5
Abbildung 3: Gensuppression durch Promotormethylierung	7
Abbildung 4: Einfluss von RASAL1 auf die Fibrogenese	9
Abbildung 5: Enzymatische Demethylierung von 5-Methylcytosin (5mC)	.11
Abbildung 6: Posttranskriptionelle Modifikation von ATP2A2	12
Abbildung 7: Ca ²⁺ -Homöostase im Kardiomyozyten	13
Abbildung 8: Blutdruck und Herzfrequenz unter Hydralazin-Einfluss im AT-II-Mausmodell	25
Abbildung 9: AT-II-Applikation im 2- und 4-Wochen-Vergleich	43
Abbildung 10: Rasal1-Expression nach AT-II-Applikation	44
Abbildung 11: Serca2-Expression nach AT-II-Expression	44
Abbildung 12: Expression von Serca2, Serca2a und Serca2b nach AT-II-Applikation	45
Abbildung 13: Promotormethylierung von Rasal1 und Atp2a2 im Gewebe	46
Abbildung 14: Normalisierung der Promotormethylierung unter Hydralazin	46
Abbildung 15: Proteinexpression nach Hydralazin-Therapie	47
Abbildung 16: Rückgang der Herzfibrose unter Hydralazin	48
Abbildung 17: Promotormethylierung von Rasal1 und Atp2a2 im Blut	49
Abbildung 18: Korrelationen muriner Promotormethylierung von Rasal1 und Fibrose-Markern	50
Abbildung 19: Korrelationen muriner Promotormethylierung von Atp2a2 und Fibrose-Markern.	.51
Abbildung 20:Normalisierung der intrasanguinalen Promotormethylierung unter Hydralazin-	
Therapie	52
Abbildung 21: Tet3-Expression nach AT-II- und Hydralazin-Applikation	52
Abbildung 22: Promotormethylierung im Humanmodell	53
Abbildung 23: Promotormethylierung bei HOCM-Patienten mit physiologischer EF	54
Abbildung 24: Schematisches Erklärungsmodell der AT-II-Applikation	57
Abbildung 25: Pathophysiologie des kardialen Remodelings bei HFpEF und HFrEF	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primer für die Quantifizierung der mRNA-Expression durch qRT-PCR	21
Tabelle 2: Primer für die Quantifizierung der Promotormethylierung durch qRT-PCR	22
Tabelle 3: Antikörper für Western Blot, Immunhistochemie- und Immunfluoreszenzfärbungen	1 2 2
Tabelle 4: Inhalt der qRT-PCR-wells mit Primern der Firma Microsynth	36
Tabelle 5: Inhalt der qRT-PCR-wells mit Primern der Firma PrimerDesign	36
Tabelle 6: Patientenkohorte mit HOCM inklusive Kontrollen	67

Abkürzungsverzeichnis

5hmC	5-Hydroxymethylcytosin	DNMT	DNA-Methyltransferase
5mC	5-Methylcytosin	dNTPs	Desoxyribonukleosid-
AAC	ascending aortic constriction		triphosphate
ABC	Avidin-Biotin-Complex	DTT	Dithiothreitol
ACE	angiotensin converting enzyme	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
AEC	2,3-Amino-9-Ethylcarbazol		(ethylendiamintetraacetic acid)
AML	akute myeloische Leukämie	EF	Ejektionsfraktion
AT-II	Angiotensin II	ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ATP	Adenosintriphosphat	EMT	epithelial-mesenchymale
ATPase	Adenosintriphosphatase		Transition
AUC	area under the curve	EndMT	endothelial-mesenchymale
BCA	bicinchoninic acid		Transition
BMP-7	bone morphogenetic protein 7	ER	endoplasmatisches Retikulum
bp	Basenpaare	ERK1/2-	
bpm	Schläge pro Minute (beats per	MAP	extracellular signal-regulated kinase
	minute)		1/2-mitogen-activated protein
BSA	Rinderserumalbumin (bovine	ESC	Europäische Gesellschaft für
	serum albumin)		Kardiologie (European Society of
Ca ²⁺	Calcium		Cardiology)
cAMP	zyklisches	ET-1	Endothelin-1
	Adenosinmonophosphat	EtOH	Ethanol
CCL2	CC-Chemokinligand 2	EZM	Extrazellularmatrix
cDNA	complementary DNA	F	forward
cfDNA	cell free DNA	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid		Dehydrogenase
CREB	cAMP-responsive element-binding	GDP	Guanosindiphosphat
	protein	GTP	Guanosintriphosphat
Ct	Threshold-Zyklus	GTPase	Guanosintriphosphatase
ctDNA	circulating tumor DNA	HCl	Salzsäure
Cu+	Kupfer	HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol		(hypertrophic cardiomyopathy)
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser	HFmrEF	heart failure with mid-range ejection
DNA	Desoxyribonukleinsäure		fraction
	(deoxyribonucleic acid)	HFpEF	heart failure with preserved ejection
DNase	Desoxyribonuklease		fraction

HFrEF	heart failure with reduced ejection	NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauschcarrier
	fraction	NFkB	nuclear factor kappa-light chain-
HIF-1α	hypoxia-inducible factor 1-alpha		enhancer of activated B-cells
НОСМ	hypertroph-obstruktive	NO	Stickstoffmonoxid
	Kardiomyopathie (hypertrophic	Oligo(dT) ₁₂₋	18-
	obstructive cardiomyopathy)	Primer	12-18-Desoxythymidin-Primer
HRP	Meerrettichperoxidase	PAS	Perjodsäure-Schiff-Reaktion
	(horseradish peroxidase)		(periodic acid-Schiff reaction)
IF	Immunfluoreszenz	Pat.	Patient
IgG	Immunglobulin G	PBS	phosphatgepufferte
IHC	Immunhistochemie		Kochsalzlösung (phosphate
IL-1β	Interleukin-1β		buffered saline)
IL-6	Interleukin-6	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat		(polymerase chain reaction)
KCl	Kaliumchlorid	PKG	Proteinkinase G
KG	Körpergewicht	PLN	Phospholamban
КНК	koronare Herzkrankheit	qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
LGE-CMR	late gadolinium enhancement	R	reverse
	cardiovascular magnetic resonance	RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-
	imaging		System
LV	linksventrikulär	RASAL1	RAS protein activator like 1
LVEF	linksventrikuläre	RASSF1	ras association domain family member
	Ejektionsfaktion		1
MBD	methyl-CpG-binding domain	RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic
MCP-1	Monozyten-		acid)
	Chemoattraktorprotein-1	RNase	Ribonuklease
MDS	myelodysplastisches Syndrom	ROC	receiver operating characteristics
MeCP	methyl-CpG-binding protein	ROS	reaktive Sauerstoffspezies
MeDIP	methylated DNA		(reactive oxygen species)
	immunoprecipitation	RR	Blutdruck (Riva-Rocci)
Mg^{2+}	Magnesium	rRNA	ribosomale RNA
miRNA	micro RNA	SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide
MMP	Matrix-Metalloproteinase		gel electrophoresis
mRNA	messenger RNA	SERCA2	sarcoplasmic / endoplasmic reticulum
MRT	Magnetresonanztomographie		Ca ²⁺ -ATPase 2
MTS	Masson-Trichrom-Färbung	SLN	Sarcolipin
Na ⁺	Natrium	SR	sarkoplasmatisches Retikulum
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat	syn.	Synonym
NaCl	Natriumchlorid	TAC	transverse aortic constriction

TBS	tris buffered saline
TBST	tris buffered saline Tween
TDG	Thymidin-DNA-Glykosylase
TE	TRIS-EDTA
TET	ten-eleven translocation methylcytosine
	dioxygenase
TGF-β	transforming growth factor beta
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
T _m	Primer-Schmelztemperatur
	(melting temperature)
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-
	aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-
	sorbitanmonolaurat
U	Umdrehungen
WHO	World Health Organization
α-SMA	alpha smooth muscle actin

1.1 Chronische Herzerkrankungen im 21. Jahrhundert

Erkrankungen des Herzens rücken immer weiter in den Fokus der internationalen Medizin und sind aufgrund ihres häufigen Auftretens und potenzieller Folgenschwere längst Teil des öffentlichen Bewusstseins geworden. Der *World Health Organization* (WHO) zufolge waren kardiovaskuläre Erkrankungen weltweit mit Abstand die häufigste Todesursache dieses Jahrhunderts – 31 % aller Todesfälle sind ihnen zuzuschreiben (WHO 2017). An erster Stelle steht hier die koronare Herzkrankheit (KHK). Führen akut-ischämische Ereignisse wie der Myokardinfarkt nicht direkt zum Tod, hinterlassen sie meist Folgeschäden, welche Struktur und Funktion des Herzens verändern und beeinträchtigen. Zum einen kann durch Ischämie das Überleben der Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) selbst betroffen sein, zum anderen ist die pulmonale und systemische Zirkulation durch eine eigeschränkte Pumpfunktion gefährdet. Neben der Ischämie stellt sich in Bezug auf chronische Herzerkrankungen ätiologisch ein heterogenes Bild vieler Pathologien dar, die durch Ursache-Wirkungs-Beziehungen miteinander verwoben sind. Vitien, Arrhythmien, Karditiden, arterielle Hypertonie und andere systemische oder organspezifische Erkrankungen können beteiligt sein und auch hereditäre Erkrankungen wie Kardiomyopathien wirken sich auf die Pathophysiologie aus.

Häufigste Folge akuter oder chronischer Myokardschädigung und gleichzeitig Endstadium vieler der genannten Erkrankungen ist die Herzinsuffizienz. Weltweit sind geschätzte 23 Mio. Menschen an einer Herzinsuffizienz erkrankt (Bui et al. 2011). Schon die Framingham-Studie stellte in den USA für diese Erkrankung ein Lebenszeitrisiko von 20 % fest (Lloyd-Jones et al. 2002). Doch auch hierzulande spielt die Herzinsuffizienz eine große Rolle. So war sie laut Statistischem Bundesamt im Jahr 2015 die dritthäufigste Todesursache in Deutschland und damit zusammen mit der chronisch ischämischen Herzkrankheit und dem akuten Myokardinfarkt für knapp die Hälfte der zehn häufigsten Todesursachen verantwortlich (Statistisches Bundesamt 2017). Dabei nimmt laut "Herzbericht 2017" der Deutschen Herzstiftung e. V. die Zahl der auf die Herzinsuffizienz zurückzuführenden Sterbefälle weiter zu. Seit 2006 ist diese Erkrankung außerdem der häufigste Grund für stationäre Krankenhausaufenthalte (Neumann et al. 2009). Damit stellt die Herzinsuffizienz nicht nur gesellschaftlich, sondern auch sozioökonomisch eine Belastung dar. Da ihre Inzidenz mit dem Alter zunimmt, ist mit Hinblick auf das Altersprofil unserer Gesellschaft mit einem weiteren Anstieg der Fallzahlen zu rechnen. Nicht nur die höhere Lebenserwartung und der allgemeine medizinische Fortschritt spielen hier eine Rolle; die zunehmende Anzahl überlebter kardialer Akutgeschehen durch verbesserte Notfall- und Intensivmedizin ist ebenfalls eine Ursache, da sie Risikofaktoren für die Entstehung einer Herzinsuffizienz darstellen (Bui et al. 2011).

Es sind zwar positive Trends in Bezug auf die Prognose erkennbar, doch zu Beginn des Jahrhunderts lag die 1-Jahres-Mortalitätsrate noch immer bei etwa 20 % (Levy et al. 2002).

Und auch die Therapie der Herzinsuffizienz ist noch wenig ausgereift. Dies betrifft vor allem eine Untergruppe der betroffenen Patienten¹. Die Europäische Gesellschaft für Kardiologie (ESC) unterteilt die Herzinsuffizienz in ihrer aktuellen Leitlinie des Jahres 2016 in drei Formen: *Heart failure with reduced ejection fraction* (HFrEF), *heart failure with mid-range ejection fraction* (HFrEF) und *heart failure with mid-range ejection fraction* (HFrEF) und *heart failure with preserved ejection fraction* (HFpEF) (Ponikowski et al. 2016). Während HFrEF durch eine EF < 40 % definiert wird, zeichnet sich HFpEF vor allem durch eine diastolische Dysfunktion mit weitgehend erhaltender EF aus (EF \geq 50 %). HFmrEF stellt eine neu definierte Zwischenform dar, die ehemals zum HFrEF-Bereich zählte. Während für Patienten mit HFrEF international etablierte Therapie-Algorithmen zur Verfügung stehen, sind bei HFpEF weder die genaue Pathophysiologie noch eigene Therapieoptionen bekannt, obwohl diese Erkrankung mindestens genauso häufig vorkommt wie HFrEF und heute schon feststeht, dass sie pathophysiologisch große Unterschiede aufweist (Borlaug und Paulus 2011).

1.2 Die Bedeutung der Herzfibrose

Trotz ihrer heterogenen Genese gleichen sich viele chronische Herzerkrankungen auf molekularer und zellulärer Ebene in der Pathomechanik. Unter dauerhafter Belastung hypertrophieren die Kardiomyozyten, während es in ihrem Zwischenraum zu einer Bindegewebsvermehrung und umstrukturierung kommt, welche die natürliche Organstruktur zerstört und zu einer progredienten Funktionseinschränkung des Herzens führt (Berk et al. 2007). Dieser Prozess wird als Fibrosierung bezeichnet und wird auch in Organen wie Niere, Lunge oder Leber beobachtet (Zeisberg und Kalluri 2013). Fibrose ist dabei das Resultat einer pathologischen Gewebsantwort auf vielgestaltige endogene oder exogene Schädigungsreize, die auf Parenchym und Stroma einwirken. Der pathologische Vorgang der Fibrogenese muss jedoch vom physiologischen Prozess der Narbenbildung im Zuge der Wundheilung abgegrenzt werden. Bei letzterer liegt meist eine akute Belastung zugrunde, die zum Zelltod einer großen Zahl von Kardiomyozyten führt, wie es bei der Ischämie-bedingten Nekrose eines Myokardinfarkts der Fall ist. Es kommt dabei zu einer lokalen Entzündungsreaktion mit Beteiligung neutrophiler Granulozyten, der Entstehung von Granulationsgewebe unter Makrophagen-Einfluss sowie der vermehrten Ablagerung von kollagenem Bindegewebe durch Fibroblasten, sodass letztlich Narbengewebe das infarzierte Parenchym ersetzt (Gurtner et al. 2008; Frangogiannis 2012). Damit ist die physiologische Wundheilung zeitlich terminiert und stagniert innerhalb einiger Wochen nach dem auslösenden Ereignis selbstlimitierend. Im Gegensatz dazu ist die Fibrogenese eine persistierende Gewebsreaktion auf länger anhaltende schädigende Reize. Dabei kommt es vor allem interstitiell und perivaskulär zu einer Vermehrung von Extrazellularmatrix (EZM), die selbst dann nicht stagniert, wenn das auslösende Ereignis längst vorüber ist (Zeisberg und Zeisberg 2013).

¹ Im Folgenden wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit ausschließlich die männliche Form benutzt. Es können dabei aber sowohl männliche als auch weibliche Personen gemeint sein.

Die während der Fibrosierung stattfindenden Veränderungen resultieren in einer alternierten Zusammensetzung und Nettoakkumulation der EZM. Neben der Grundsubstanz besteht diese physiologischerweise aus kollagenen, elastischen und retikulären Fasern. Anders als früher angenommen, bildet sie kein bloßes Haltegerüst der funktionellen Zellen, sondern unterstützt als dynamisches System deren Proliferation und Differenzierung, während sie im kontraktilen Zyklus des Herzens für eine optimierte Kräfte-Translation sorgt (Weber 1989; Lukashev und Werb 1998). Durch die Regulation von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und ihre endogenen Inhibitoren (TIMPs) steht die Zusammensetzung der EZM in einem Gleichgewicht, dessen Störung letztlich zu Einschränkungen der kardialen Funktion führen kann (Spinale 2007).

Die ätiologischen Stimuli kardialer Fibrose sind zahlreich. Druckbelastung durch arterielle Hypertonie, aortale Stenosierung oder systemische Vasokonstriktion zählen ebenso zu den potenziellen Auslösern wie eine durch Klappeninsuffizienz bedingte Volumenbelastung des Herzens, verschiedene Formen der Kardiomyopathie oder systemische Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus (Borer et al. 2002; Asbun und Villarreal 2006; Berk et al. 2007; Ashrafian et al. 2011). Nahezu alle Formen des eingangs diskutierten Kreises chronischer Herz-assoziierter Erkrankungen – so auch die Herzinsuffizienz – kommen damit als Induktoren der Fibrogenese infrage (González et al. 2018).

Unabhängig vom auslösenden Reiz oder dem betroffenen Organ sind aktivierte Fibroblasten die wichtigsten zellulären Mediatoren im Kontext der Fibrose (Zeisberg und Neilson 2010). Obwohl der Großteil des myokardialen Volumens von Kardiomyozyten eingenommen wird, stellen residente Fibroblasten zahlenmäßig mit 70 % den größten Anteil der Zellen im Herzen dar (Banerjee et al. 2007). Sie sind ortsständige Zellen spindelförmiger Gestalt und mesenchymalen Ursprungs. Ihre Aufgabe besteht unter anderem in der Orchestrierung von Synthese und Umsatz der EZM, deren Bestandteile von ihnen im Gleichgewicht gehalten werden. Sie produzieren vornehmlich Kollagen der Typen 1 und 3, welche in gesunden Primatenherzen etwa 85 % bzw. 11 % aller Kollagenfasern ausmachen (Weber et al. 1988). Diese Homöostase wird vornehmlich durch die oben beschriebenen MMPs und TIMPs aufrechterhalten, welche ebenfalls von Fibroblasten synthetisiert werden.

Im Zuge der Fibrogenese findet eine Aktivierung der Fibroblasten statt, welche konsekutiv auch Myofibroblasten genannt werden. Nach ihrer Aktivierung ändert sich ihr Verhalten. Sie zeigen erhöhte proliferative Aktivität und produzieren vermehrt Kollagenfasern sowie Laminin und Fibronektin (Gabbiani et al. 1971). Gleichzeitig erlangen sie kontraktile Eigenschaften, die durch ihre Expression von *alpha smooth muscle actin* (α -SMA) zu erklären ist. Dieses Protein wird von residenten Fibroblasten nicht synthetisiert, dient im Zuge der Wundheilung aber durch die Erhöhung der Zellmobilität der lokalen Ablagerung von EZM (Tomasek et al. 2002). Der Aktivierungsmechanismus der Fibroblasten bzw. die Herkunft der Myofibroblasten ist noch nicht endgültig geklärt; es gibt jedoch Hinweise, dass sie aus verschiedenen Vorläuferzellen hervorgehen (Abbildung 1). Zu diesen zählen residente Fibroblasten, residente und zirkulierende Progenitorzellen wie Fibrozyten, Epithelzellen und Endothelzellen. Letztere sind Teil von Epithelial-mesenchymaler sowie Endothelial-mesenchymaler Transition (EMT und EndMT). Beide Mechanismen kommen in der Embryogenese vor, sind neueren Studien zufolge jedoch auch im Kontext von Wundheilung, Fibrogenese und Tumormetastasierung relevant und kausal an diesen Prozessen beteiligt (Zeisberg et al. 2007; Kalluri und Weinberg 2009). Zellpolarität und Zell-Zell-Adhäsion gehen dabei verloren und migrationsfähige mesenchymale Stromazellen entstehen, die dank ihrer Multipotenz die Fähigkeit zu verschiedenartiger Differenzierung besitzen.



Abbildung 1: Herkunft von Myofibroblasten in fibrotischen Herzen. Residente Fibroblasten, Progenitorzellen, Endothel- und Epithelzellen konnten als Ursprungszellen von Myofibroblasten identifiziert werden.

Molekulare Zellsignalwege, welche zur Aktivierung der Fibroblasten führen, sind bisher nur unvollständig verstanden. Im Allgemeinen gilt jedoch der transforming growth factor beta 1 (TGF-β1) als der bedeutendste profibrotische Wachstumsfaktor im Kontext von Organfibrose (Leask und Abraham 2004; Dobaczewski et al. 2011). Das multifunktionale Zytokin gehört zur TGF-β-Superfamilie, welche neben den in Säugetieren vorkommenden TGF-Isoformen 1-3 weitere Proteine umfasst und an embryogenetischen Vorgängen sowie an Entzündung, EZM-Produktion, Zellproliferation und -differenzierung im Erwachsenen beteiligt ist. TGF-B1 wird als inaktives Homodimer ubiquitär exprimiert, vor allem jedoch von Fibroblasten, Endothel- und hämatopoetischen Zellen. Um seine Wirkung durch Rezeptorbindung zu entfalten, bedarf die latente Form einer extrazellulären Aktivierung. Dies kann je nach Auslöser auf verschiedenen Wegen geschehen. Beteiligt sind unter anderem Proteasen wie Plasmin, MMP-2 und -9 sowie Thrombospondin 1 (Annes et al. 2003). Aber auch reactive oxygen species (ROS) und ein niedriger pH-Wert können eine Aktivierung herbeiführen (Kong et al. 2014). Die aktivierte Form kann nun mit den transmembranösen TGF-\beta-Rezeptoren interagieren, von denen drei Typen existieren, die zu den Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren zählen. TGF-^{β1} bindet an den TGF-^β-Rezeptor 2, was zur Rekrutierung des TGF-β-Rezeptors 1 führt. Es entsteht dadurch ein heterotetramerer Komplex, dessen Serin- und Threonin-Residuen transphosphoryliert werden, woraufhin die intrazelluläre Fortleitung der Signalkaskade erfolgt (Piek et al. 1999). Besonders relevant im Kontext von Fibrose ist die SMAD-Kaskade, welche durch Phosphorylierung am TGF-β-Rezeptor 1 ihren Ausgang nimmt und im Zellkern in der Beeinflussung der Genexpression durch den Transkriptionsfaktor SMAD4 mündet (Heldin et al. 1997). Bei gesteigerter TGF-\B1-Expression kommt es neben der Fibroblastenaktivierung und -proliferation samt der konsekutiv gesteigerten EZM-Produktion zur Hypertrophie von Kardiomyozyten, der Inhibierung von Kollagenasen und zur Induktion von EMT/ EndMT (Hinz et al. 2012). Auch auf andere Zellen wie Lymphozyten und Makrophagen hat

TGF-β1 Einfluss, indem der Wachstumsfaktor ihre Sekretion von profibrotischen Zytokinen oder Entzündungsmediatoren moduliert (Leask und Abraham 2004).

Auch die Hypoxie spielt in der Pathogenese eine entscheidende Rolle. Fibrotisches Gewebe weist im Allgemeinen eine verminderte Durchblutung und verringerte Mikrovaskularisierung auf, weshalb es makroskopisch blass erscheint. Die Hypoxie selbst trägt auf direktem Wege über HIF-1α-vermittelte Signalwege zur Fibrose bei (Higgins et al. 2007). EndMT führt ebenfalls zur Abnahme der Vaskularisierung und damit auch auf diese Weise zu Fibrose (Rieder et al. 2011).

Viele weitere zelluläre und nicht-zelluläre Mediatoren der Fibrogenese sind bekannt. So haben beispielsweise ROS neben TGF-β1-aktivierenden Eigenschaften auch direkte Effekte auf die EZM-Ablagerung und modulieren durch Zytokine und Angiotensin-II (AT-II) kardiale Fibroblasten (Cheng et al. 2003). AT-II wiederum aktiviert ROS-sensitive Kinasen, welche ihrerseits an der Fibrogenese beteiligt sind (Ohtsu et al. 2005). Anderseits können ROS durch die Aktivierung von MMPs auch zum EZM-Abbau führen (Siwik et al. 2001).

Zu den bei Fibrose pathophysiologisch relevanten Zytokinen zählt zum Beispiel der CC-Chemokinligand 2 (CCL2, syn. MCP-1). Er wird bei ischämischer und Hochdruck-induzierter Herzfibrose vermehrt exprimiert, während seine Hemmung zur Abnahme von Fibrose führt (Dobaczewski und Frangogiannis 2009). Die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 haben pleiotrope Effekte. Ihre Expression wird in fibrotischem Myokard konsistent induziert (Torre-Amione et al. 1996; Francis et al. 1998), wirken der Fibrosierung *in vitro* durch Hemmung der Kollagensynthese und Induktion der MMP-Expression aber auch entgegen (Bujak et al. 2008).

Auch Hormone sind bei der Entstehung von Herzfibrose involviert. Das Peptidhormon Endothelin-1 (ET-1) kann von TGF- β 1 und AT-II induziert werden und wird in insuffizienten Humanherzen sowie bei muriner Hochdruck-induzierter Herzfibrose gefunden (Yamamoto et al. 2000; Leask 2010). Im Kontext der Fibrogenese ist auch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) von entscheidender Bedeutung (**Abbildung 2**). AT-II hat sich als potenter Induktor der Fibroblasten-Proliferation sowie deren Kollagensynthese erwiesen – einerseits direkt durch Rezeptorbindung, andererseits durch die indirekte Modulation von TGF- β 1 (Weber und Brilla 1991; Sadoshima und Izumo 1993). Dabei hat AT-II durch Bindung an periphere AT1-Rezeptoren auch systemische Auswirkungen auf den Blutdruck, was zu einer Nachlasterhöhung des Herzens mit resultierender kardialer Hypertrophie samt Fibrose führt. Neben AT-II ist schließlich auch Aldosteron ein profibrotischer Stimulus des RAAS (Lijnen und Petrov 2000).



Abbildung 2: RAAS-Signalkaskade.

In fibrotischem Gewebe sind die durch die beschriebene Vielfalt an profibrotischen Stimuli aktivierten Fibroblasten für die Ablagerung von EZM im Interstitium verantwortlich, die im Gegensatz zur Narbenbildung diffus statt lokal begrenzt stattfindet. Ein Verlust an Elastizität und vermehrte Steifheit der Ventrikel sind die Folge. Durch die Umstrukturierung des funktionalen Myokards (*Remodeling*) wirkt sich Fibrose direkt auf die systolische sowie diastolische Pumpfunktion des Herzens aus (Janicki und Brower 2002). Die Umstrukturierung von EZM-Strukturen kann die elektromechanische Kopplung sowie die Koordination der nachfolgenden Transduktion kardialer Kontraktionen stören und damit den Wirkungsgrad der systolischen Funktion verringern (Janicki und Brower 2002; Baicu et al. 2003). Außerdem kann ein Auseinandergleiten von Kardiomyozyten als Resultat der Fibrosierung zur Verringerung der Wanddicke und in der Folge zu einer Ventrikeldilatation führen sowie *Reentry*-Erregungen provozieren (Beltrami et al. 1994).

1.3 Epigenetische Regulationsmechanismen

Die Prozesse der Wundheilung und der Fibrogenese sind beide mit einer vermehrten Ablagerung von EZM assoziiert, wobei diese wie dargelegt bei letzterer persistiert. Beide reagieren auf ähnliche Parenchymschäden, teilen sich aktivierende Mediatoren wie TGF-β1 und involvieren die gleichen Effektorzellen. Bei Isolierung und Kultivierung von Fibroblasten aus fibrotischen Organen behalten diese jedoch im Gegensatz zur Wundheilung ihren aktivierten Zustand bei, was auf eine Konsolidierung dieser Aktivierung über den Einfluss von zellulären und humoralen Mediatoren hinaus hindeutet (Weber und Brilla 1992; Zeisberg et al. 2000). Obwohl die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen noch unvollständig verstanden sind, beschreiben die Erkenntnisse der letzten Dekaden die fundamentale Rolle der Epigenetik bei der Fibrogenese und ihrer Abgrenzung zur Wundheilung.

Epigenetik beschreibt die Alteration von Genfunktionen, die nicht auf eine veränderte Nukleotidsequenz zurückzuführen sind. Sie spielt eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Genexpression im Rahmen der Embryogenese, von Zelldifferenzierung und der Pathogenese von Erkrankungen wie Krebs oder eben Fibrose (Egger et al. 2004). Epigenetische Mechanismen umfassen DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und nicht-kodierende microRNA (miRNA). Besonders erstere ist entscheidend für die kardiale Fibrogenese und Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Dabei katalysieren die DNA-Methyltransferasen DNMT1, DNMT3a und DNMT3b am fünften C-Atom eines Cytosin-Rings die Addition einer Methylgruppe, sodass 5-Methylcytosin (5mC) entsteht (Abbildung 3). Diese Reaktion findet vor allem in DNA-Regionen mit gehäuft vorkommenden Cytosin-Guanin-Dinukleotiden (CpG-Inseln) statt, welche oft in proximalen Promotorbereichen von Genen zu finden sind, wo sie normalerweise in einem unmethylierten Zustand vorliegen (Neary et al. 2015). Etwa 70 % aller Gene weisen CpG-Inseln im proximalen Promotorbereich auf (Estécio und Issa 2011). Ist eine große Anzahl seiner Cytosin-Residuen methyliert, hat dies einen suppressiven Effekt auf die Transkription des entsprechenden Gens (Bird und Wolffe 1999). Dieses Prinzip wurde zuerst im Rahmen der Krebsforschung entdeckt, wo DNA-Methylierung die Transkription entscheidender Tumorsuppressorgene hemmen kann (Zeisberg und Zeisberg 2013). Es sind hierbei zwei maßgebliche Downstream-Mechanismen bekannt. Einerseits kann eine CpG-Hypermethylierung die Bindung von Transkriptionsfaktoren wie CREB, HIF oder NFkB

direkt blockieren (Das und Singal 2004). Andererseits kann sie die Anlagerung von Proteinkomplexen fördern, welche die methyl-CpG binding domain (MBD) erkennen und die Gentranskription durch ihre Assoziation mit Histon-modifizierenden Enzymen hemmen, wie es zum Beispiel bei den Komplexen MeCP1, MeCP2 und MBD1 der Fall ist. Auch Genkörper können von DNA-Methylierung betroffen sein. Im Gegensatz zur Suppression durch Promotorhypermethylierung bedingt eine hohe Transkriptionsrate oft eine intragenetische Methylierung der DNA, die durch die Attraktion von DNMTs durch RNA-Polymerasen erklärt wird (Hellman und Chess 2007). Transposons und Retrotransposons schließlich liegen als repetitive Elemente physiologischerweise ebenfalls im methylierten Zustand vor, was auf Gentranskription jedoch keinen Effekt hat (Schulz et al. 2006). Es spricht vieles dafür, dass die DNA-Methylierung bei der kardialen Fibrogenese zu großen Teilen für die dauerhafte Aktivierung von Fibroblasten verantwortlich ist (Grimaldi et al. 2017; Tao et al. 2018). Hypoxie gilt als maßgeblicher Induktor der Hypermethylierung und damit auch auf diesem Wege als wichtiger profibrotischer Stimulus in kardialen Fibroblasten. Sie kann zur Induktion von HIF-1a führen, was wiederum die vermehrte Expression von DNMTs zur Folge hat, welche dann durch Promotorhypermethylierung die Expression profibrotischer Gene anregen (Watson et al. 2014). In murinen Myofibroblasten des Herzens ist beispielsweise eine vermehrte Expression von DNMT3a mit einer Induktion der für Zellproliferation und -differenzierung relevanten ERK1/2-MAP-Kinasen sowie einer Suppression des Tumorsuppressorgens RASSF1A assoziiert, welches an der Fibroblastenaktivierung bei Herzfibrose beteiligt ist (Tao et al. 2014). DNA-Methylierung ist bei alldem jedoch kein isolierter Wirkprozess; vielmehr funktioniert sie im Zusammenspiel mit Histonmodifikationen und miRNA-Veränderungen (Yu und Xu 2015).



Abbildung 3: Gensuppression durch Promotormethylierung. DNA-Methyltransferasen katalysieren die Addition einer Methylgruppe an das fünfte C-Atom des Cytosinrings; 5mC entsteht.

1.4 RASAL1 im Fokus fibrotischer Pathophysiologie

Als besonders relevant im Kontext von Nieren- und Herzfibrose hat sich das Protein RASAL1 erwiesen. Bechtel et al. identifizierten seinen Zusammenhang zur renalen Fibrose in einem genomweiten Methylierungsscreening der DNA von isolierten Fibroblasten gesunder sowie fibrotischer Humannieren (Bechtel et al. 2010). Zwölf Gene wiesen dabei eine konsistente Promotorhypermethylierung in den Fibroblasten erkrankter Nieren auf; drei der entsprechenden Proteine waren im Gewebe der fibrotischen Nieren supprimiert. Eines von ihnen war RASAL1. Das RASAL1-Protein gehört zur Ras-GTPase-aktivierenden Proteinfamilie und katalysiert die Inhibition des monomeren G-Proteins Ras und damit dessen proliferationsfördernde Aktivität im Zellstoffwechsel. In der Konsequenz wird aktives GTP-Ras zu inaktivem GDP-Ras hydrolysiert (Downward 2003). Wird RASAL1 gehemmt, kommt es zu vermehrtem Zellwachstum durch ungebremstes Ras-*Signalling*. Im Kontext von Fibrose werden dann Fibroblasten zur Proliferation und Produktion extrazellulärer Matrix angeregt (Walker et al. 2004). RASAL1 hat damit einen direkt kausalen Einfluss auf die Entstehung von Fibrose (**Abbildung 4**).

Auch im Herzen konnte eine Beteiligung der *RASAL1*-Hypermethylierung an der Fibrogenese festgestellt werden (Grimaldi et al. 2017). Xu et al. zeigten in humanen Koronar-Endothelzellen, dass die Applikation von TGF- β 1 zur aberranten *RASAL1*-Promotormethylierung und in der Folge zur transkriptionellen Suppression von RASAL1 führt (Xu et al. 2015). Außerdem wurde eine verstärkte Assoziation von TGF- β 1 und der Induktion von EndMT in RASAL1-supprimierten Zellen festgestellt, was auf eine kausale Beteiligung der *RASAL1*-Promotorhypermethylierung an EndMT hinweist. Die Ergebnisse von Xu et al. liefern erste Hinweise, dass im Herzen eine Korrelation zwischen *RASAL1*-Promotormethylierung und Fibrosegrad besteht und erstere damit als Biomarker für die Erkrankung dienen könnte. Auch im Mausmodell konnte der Zusammenhang zwischen RASAL1 und Herzfibrose bestätigt werden. Das Zytokin *bone morphogenetic protein 7* (BMP-7) wirkt als Antagonist des TGF- β 1-*Signallings* der aberranten *RASAL1*-Promotormethylierung und - Suppression entgegen und mindert kardiale Fibrose (Xu et al. 2015).

Die zuvor erwähnten Mechanismen aberranter DNA-Methylierung spielen auch im RASAL1-Zellsignalweg eine Rolle. Es gibt Hinweise, dass MeCP2 maßgeblich an der RASAL1-Expression beteiligt ist und diese kontrolliert (O'Reilly 2017). In Myofibroblasten eines murinen MeCP2-Knockdown-Modells wurde Rasal1 im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen vermehrt exprimiert (Tao et al. 2011).

Nicht nur in Niere und Herz ist RASAL1 Teil der Pathophysiologie von Fibrose. In pulmonalen Fibroblasten sind TGF- β 1 und EndMT ebenfalls an der Fibrogenese beteiligt (Hashimoto et al. 2010; Neary et al. 2015). Schließlich hat sich der Ras-Inhibitor auch in der Leber als relevant im Kontext dieses Krankheitsbildes erwiesen, wo er die Transformation hepatischer Stammzellen zu fibrogenetischen Zellen fördert (Tao et al. 2011; Takata et al. 2017). Damit ist der Wirkmechanismus von RASAL1 nicht auf ein Organ beschränkt, sondern scheint in verschiedenen Organsystemen verankert zu sein, was seine Relevanz in der Fibrogenese unterstreicht.

Der Zusammenhang zwischen RASAL1 und kardialer Fibrose wird inzwischen auch auf einen diagnostischen Einsatz hin überprüft. Da sie neben der kausalen Beziehung der RASAL1-Promotormethylierung auch eine Korrelation zum Fibrosegrad messen konnten, war es Tampe et al. möglich, die in Gewebe sowie Blut gemessene aberrante Rasal1-Promotormethylierung im Mausmodell als Biomarker für renale Fibrose zu etablieren (Tampe et al. 2014a). Die Frage, inwiefern sich die Methylierungsmessung auch für Herzfibrose als Biomarker eignet und ob dieser Zusammenhang auch beim Menschen besteht, blieb bisher unerforscht und stellt auf Grundlage der dargelegten Studienlage ein zentrales Motiv dieser Arbeit dar.



Abbildung 4: Einfluss von RASAL1 auf die Fibrogenese. Natürlicherweise unmethylierte RASAL1-Promotorregionen lassen eine Transkription des Gens zu. RASAL1 inaktiviert GTP-Ras. Eine Hypermethylierung des RASAL1-Promotors führt zur Suppression der RASAL1-Transkription und dies zur vermehrten Aktivierung von GDP-Ras zu GTP-Ras. Die Folge sind Fibroblastenaktivierung und Fibrose.

1.5 Therapie durch Demethylierung

Die Bedeutsamkeit und Vielfalt epigenetischer Genregulationsmechanismen bei Organfibrose lassen auf die Identifizierung verschiedener molekularer Angriffspunkte für pharmakologische Therapeutika hoffen, welche die Organfunktion erhalten und eine Krankheitsprogression eindämmen könnten. Aus dem Umstand, dass aberrante DNA-Promotormethylierung kausal an der Suppression betroffener Genprodukte beteiligt ist, ergibt sich die Hypothese, dass ein Rückgang der Methylierung zu einer normalisierten Proteinexpression führt. Dieser Ansatz war Grundlage für die Veröffentlichung vieler Arbeiten, welche das Ziel verfolgten, neue Therapieoptionen für epigenetisch bedingte Krankheiten zu erforschen.

Mittlerweile sind diverse demethylierende Agenzien bekannt. Eines von ihnen ist 5'-Azacytidin, ein synthetisches Nukleosid mit zytostatischer Wirkung. Es wurde im Jahr 2008 unter dem Handelsnamen "Vidaza" von der europäischen Arzneimittelagentur zugelassen und wird bei myelodysplastischem Syndrom (MDS) und akuter myeloischer Leukämie (AML) eingesetzt (Fenaux et al. 2009; Smith et al. 2014). Als Cytidin-Analogon wird es während der Replikation in die DNA eingebaut und hemmt die Wirkung der DNMTs durch deren irreversible Bindung an die DNA (Christman 2002). Das Resultat ist eine reduzierte DNA-Methylierung in der mitotischen Tochtergeneration durch Einbau von unmethyliertem Cytosin in die DNA und die konsekutiv vermehrte Expression der zuvor durch Promotorhypermethylierung supprimierten Proteine. Auch bei Organfibrose zeigt der Arzneistoff Wirkung, wie Experimente an murinen Nieren zeigen konnten (Bechtel et al. 2010). Der antifibrotische Effekt wird der Demethylierung der RASAL1- sowie RASSF1-Promotoren zugeschrieben (Grimaldi et al. 2017). Da 5'-Azacytidin jedoch unspezifisch wirkt, kommt es zu teils schwerwiegenden zytotoxischen Nebenwirkungen.

Deutlich spezifischer wirken Hydralazin bzw. Dihydralazin. Beide Arzneistoffe teilen sich den Wirkmechanismus und unterschieden sich nur in ihrer Pharmakokinetik. Sie wurden in den 1950er Jahren entdeckt und wegen ihres vasodilatatorischen Effekts als Antihypertensiva zugelassen (Wilkinson et al. 1952). Noch heute finden sie als Drittrangmedikamente in der Hypertonie-Therapie Anwendung (James et al. 2014). Beide relaxieren die glatte Gefäßmuskulatur und führen durch systemische Vasodilatation zu einer Nachlastsenkung des Herzens. Daher werden sie auch gegen Herzinsuffizienz eingesetzt, wobei ACE-Hemmer hier mittlerweile einen höheren Stellenwert besitzen (Farag et al. 2015). Tampe et al. konnten im Mausmodell und am Patienten zeigen, dass Hydralazin auch gegen Nierenfibrose genutzt werden kann (Tampe et al. 2014a). Diese Beobachtung wurde bei dem Einsatz einer Arzneimitteldosierung gemacht, welche unter der Wirksamkeitsgrenze gegen Hypertonie liegt, sodass der therapeutische Effekt nicht durch Blutdruckregulation erklärt werden konnte. Die Wirkung beruht vielmehr auf DNA-Demethylierung. Ungleich 5'-Azacytidin, "passivem" **DNMT-Hemmung** welches auf Weg durch die Weitergabe der Promotorhypermethylierung an die nächste Zellgeneration verhindert, funktioniert Hydralazin unabhängig von der Replikation noch in derselben Generation. Es verändert die methylierten Cytosin-Residuen "aktiv" dermaßen, dass sie von der Basenexzisionsreparatur erkannt und durch unmethyliertes Cytosin ersetzt werden (Zeisberg und Zeisberg 2013). Der Mechanismus basiert hauptsächlich auf der Aktivität der ten-eleven translocation (TET)-Enzyme, welche die Addition einer Hydroxylgruppe an den Methylrest katalysieren (Abbildung 5). Insbesondere TET3 scheint bei Hydralazin-Therapie relevant zu sein. Es entsteht 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC), welches nach weiteren Zwischenschritten schließlich von der Thymidin-DNA-Glykosylase (TDG) durch einfaches Cytosin ersetzt wird. TET-Proteine erkennen üblicherweise Gene mit CXXC-Motiven in ihrer Promotorregion. RASAL1 gehört zu diesen Genen und stellt damit einen spezifischen Angriffspunkt dar (Zeisberg und Zeisberg 2016). Eine Reaktion, welche 5mC direkt ersetzt, ist bislang nicht bekannt.

Schließlich zählt auch das bereits erwähnte BMP-7 zu den epigenetisch aktiven Agenzien. Der TGF- β 1-Antagonist wirkt sowohl im Herzen als auch in der Niere parenchymatöser Fibrose und EndMT entgegen (Zeisberg et al. 2003; Xu et al. 2015). Der Wirkmechanismus beruht jedoch nicht nur auf der Hemmung der TGF- β 1-Signalkaskade, sondern funktioniert ähnlich wie Hydralazin auch durch TET3-vermittelte Demethylierung, wie am *Rasal1*-Promotor der murinen Niere gezeigt werden konnte (Tampe et al. 2014b).

Ein neuer Ansatz ist die genspezifische Hydroxymethylierung von Promotorregionen. Die Fusion des bakteriellen dCas9-Proteins, das durch Deaktivierung seiner Endonuklease-Funktion nur seine Bindungsaktivität spezifischer DNA-Abschnitte behält, und der katalytischen Domäne des TET3-Proteins ermöglicht die durch *guiding RNAs* vermittelte genspezifische Promotorbindung und Hydroxymethylierung (Xu et al. 2018). Xu et al. konnten mit dieser Methode *in vitro* sowie *in vivo* eine Restauration der Genexpression sowie einen Rückgang renaler Fibrose bewirken und verwendeten dabei als Zielstruktur neben anderen Fibrose-assozierten Genen auch RASAL1.



Abbildung 5: Enzymatische Demethylierung von 5-Methylcytosin (5mC). Die zu den DNA-Hydroxylasen zählenden Tet-Enzyme katalysieren die Hydroxylierung von 5mC zu 5hmC; unter Hydralazin-Therapie ist hieran vor allem Tet3 beteiligt. 5hmC reagiert durch Tet1-3 über 5-Formylcytosin zu 5-Carboxylcytosin. Die DNA-Glykosylasen Tdg und Smug1 lassen daraufhin unmodifiziertes Cytosin entstehen. Alternativ wandeln die Cytidin-Deaminasen Aicda und Apobec1/3 5hmC zu 5-Hydroxymethyluracil oder Thymin um, an denen wiederum Tdg und Smug1 angreifen und nacktes Cytosin generieren. *Abb. modifiziert nach Tampe et al. 2014a*.

1.6 Die zentrale Rolle der Ca²⁺-Pumpe SERCA2

Neben RASAL1 wurde im Rahmen dieser Arbeit auch das Gen ATP2A2 betrachtet. Es kodiert für die sarcoplasmic/ endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase 2 (SERCA2) – eine Calcium-Pumpe, welche in der Membran des Sarko- bzw. Endoplasmatischen Retikulums (SR/ER) der Zelle verankert ist und jeweils zwei Ca²⁺-Ionen unter Verbrauch eines ATP-Moleküls aus dem Zytosol in das Lumen des Retikulums transportiert (Vandecaetsbeek et al. 2011). Damit wird einerseits die niedrige Ca²⁺-Konzentration des Zytosols im Ruhezustand aufrechterhalten, andererseits ist sie für die Füllung des intraluminalen Ca²⁺-Speichers des SR/ER verantwortlich. Dieser ermöglicht die Ca²⁺-getriggerte Entleerung, welche zu einer Vielzahl an Reaktionen wie beispielsweise der Zellkontraktion oder der Ausschüttung von Hormonen wie Insulin führt. Gleichzeitig werden im Innern des SR/ER durch die hohe Ca2+-Konzentration die notwendigen Bedingungen für die Funktion vieler lokaler Enzyme geschaffen, welche essentielle Rollen in der Protein- und Lipidsynthese oder der Zellproliferation spielen (Wuytack et al. 2002). Neben SERCA2 erfüllen auch SERCA1 und SERCA3 als Teil derselben Proteinfamilie eine ähnliche Funktion, sollen an dieser Stelle jedoch nicht thematisiert werden. Das Genprodukt von ATP2A2 erfährt posttranskriptionelles alternatives Splicing (Abbildung 6) (Lytton et al. 1989), sodass vier bekannte Isoformen entstehen: SERCA2a, SERCA2b, SERCA2c und SERCA2d. Die letzteren beiden sind kaum erforscht und ihre physiologische Rolle ist nahezu unbekannt (Gélébart et al. 2003; Kimura et al. 2005).



Abbildung 6: Posttranskriptionelle Modifikation von *ATP2A2*. Alternatives Splicing an Nukleotid-Position 2981 im Exon 20 des Gens *ATP2A2* führt zur Generierung der Isoformen SERCA2a und SERCA2b. Schwarze Abschnitte repräsentieren nicht-translatierte Regionen.

SERCA2a ist die am besten untersuchte der genannten Isoformen. Sie gilt als die Isoform der Herzsowie der Skelettmuskulatur und ist essentiell an der elektromechanischen Kopplung beteiligt (Abbildung 7) (Verboomen et al. 1992). Zu Beginn der Kontraktion strömt Calcium aus dem Extrazellularraum durch die spannungsabhängigen Dihydropyridinrezeptoren in das Zytosol. Im Herzen bindet es dort an die Ryanodinrezeptoren des SR und bewirkt ihre Öffnung, sodass durch diesen Trigger große Ca2+-Mengen durch sie hindurch ins Zytosol strömen. Auch im Skelettmuskel stammt das Gros an Ca²⁺ aus dem SR. Wenn ihre zytosolische Konzentration hoch genug ist, binden die Ca²⁺-Ionen an Troponin C, sodass daraufhin durch Umlagerung des Tropomyosins die Myosin-Bindungsstelle an den Aktinfilamenten freigelegt werden. Während der Relaxationsphase wird das Ca²⁺ aus dem Zytosol entfernt, indem es zum einen durch Na⁺/Ca²⁺-Austauschcarrier (NCX) und zum anderen durch Ca²⁺-ATPasen zurück in den Extrazellularraum befördert wird. Ein anderer Weg des Ca²⁺ aus dem Zytosol ist sein Transport in das SR. Diese Aufgabe übernimmt SERCA2a und ist damit maßgeblich an der Regulation des Ca2+-Rücktransports und damit der Geschwindigkeit und Stärke von Kontraktion und Relaxation beteiligt (Periasamy und Huke 2001). Physiologischerweise werden beim Menschen während jedes kardialen Kontraktionszyklus ca. 70 % des intrazellulären Ca²⁺ auf diese Weise in das SR befördert (Frank et al. 2002), während nur 30 % die Zelle über ihre Membran verlassen; im Skelettmuskel spielt das SR als Ca²⁺-Speicher sogar eine noch größere Rolle. Die Regulation von SERCA2a steht damit im direkten Zusammenhang zur kardialen Pumpfunktion. Es existieren dabei verschiedene Regulationsmechanismen (Periasamy et al. 2008). Das Protein Phospholamban (PLN) inhibiert SERCA2a im dephosphorylierten Zustand, während es die Ca2+-ATPase nach Phosphorylierung durch cAMP-abhängige Proteinkinasen enthemmt (MacLennan und Kranias 2003). Dadurch wird die Ca²⁺-Aufnahme des SR gesteigert. So kann nach β-adrenerger Stimulation und konsekutivem cAMP-Anstieg die Relaxationszeit der Kardiomyozyten verkürzt und ihre Kontraktilität gesteigert werden. Ähnlichen Prinzipien folgt auch die Regulation durch Sarcolipin (SLN). Dieses Protein geht ebenfalls eine inhibierende Bindung mit der Ca^{2+} -ATPase ein, die durch Phosphorylierung gelöst werden kann (Asahi et al. 2004). Eine Superinhibition durch ein PLN-SLN-Heterodimer wurde beschrieben (Asahi et al. 2003).

SERCA2b gilt als ubiquitär exprimierte Housekeeping-Isoform (Verboomen et al. 1992). Sie unterscheidet sich von SERCA2a lediglich durch ein verändertes Carboxylende, dessen vier terminale

Aminosäuren durch eine hydrophobe Abfolge von 49 Aminosäuren ersetzt wird. Dies führt zu Veränderungen in der Pumpfunktion der Ca²⁺-ATPase. Im Vergleich zu SERCA2a weist SERCA2b eine etwa doppelt so hohe Ca²⁺-Affinität, jedoch eine niedrigere katalytische Aktivität auf (Vandecaetsbeek et al. 2009). Im Herzen kommt SERCA2b insgesamt deutlich weniger stark zur Expression als SERCA2a (Vangheluwe et al. 2003). Zu einer spezifischen Rolle, welche SERCA2b auch in der Herzphysiologie einnehmen könnte, ist wenig bekannt.

Die Verknüpfung der Ca²⁺-ATPase SERCA2 zum epigenetischen Kontext dieser Dissertation ergibt sich aus den Ergebnissen der Arbeiten von Kao et al. Diese konnten in murinen Kardiomyozyten zeigen, dass der *ATP2A2*-Promotor durch seinen Gehalt an CpG-Inseln durch DNA-Methylierung regulierbar ist (Kao et al. 2010). Des Weiteren kam es bei der Behandlung mit Hydralazin zur Demethylierung des *Atp2a2*-Promotors und einer konsekutiv verstärkten Serca2a-Expression (Kao et al. 2011). Dies deutet darauf hin, dass SERCA2 ähnlichen epigenetischen Regulationsmechanismen unterliegt wie RASAL1.

Bei Herzinsuffizienz ist die SERCA2-Expression vermindert, was zu einer gestörten systolischen Kontraktilität des Herzens führt (Hasenfuss et al. 1994). Eine Restaurierung der Proteinexpression ist damit ein vielversprechender Therapieansatz.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es von Interesse, ob kardiale Fibrose mit einer potenziellen Promotormethylierung auch von *ATP2A2* samt Expressionsverlust des SERCA2-Proteins vergesellschaftet ist und welche Rolle die verschiedenen Isoformen in diesem Kontext einnehmen.



Abbildung 7: Ca²⁺-Homöostase im Kardiomyozyten. Dihydropyridinrezeptoren (DHPR) sind spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle in den kardiomyozytären T-Tubuli, die infolge eines Aktionspotentials sog. "Trigger-Ca^{2+"} aus dem Extrazellularraum (EZR) in den Intrazellularraum (IZR) des Kardiomyozyten leiten. Dieses aktiviert Ryanodinrezeptoren (RyR2) des SR. Diese Ca²⁺-Kanäle leiten weiteres Ca²⁺ aus dem Lumen des SR in den IZR, wo es über Bindung an Troponin C die Kontraktion initiiert. Während der Relaxation gelangt das Ca²⁺ zum einen über NCX und Ca²⁺-ATPasen im Sarkolemm aus der Zelle, den Großteil transportiert SERCA2a jedoch zurück ins SR.

1.7 Zielsetzung der vorliegenden Dissertation

Trotz großer wissenschaftlicher Aufmerksamkeit und verstärkter Suche nach therapeutischen Optionen ist die Herzinsuffizienz noch immer eine der häufigsten Todesursachen in Deutschland. Die Assoziation dieser Erkrankung mit Herzfibrose und deren Verbindung zur Epigenetik wurden erst in jüngerer Zeit deutlich. Das Protein RASAL1 fiel im Kontext von Organfibrose zuerst in der Niere auf (Bechtel et al. 2010). Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Zeisberg konnten im *ascending aortic constriction* (AAC)-Mausmodell zeigen, dass es auch im Herzen an der Pathogenese von Fibrose beteiligt ist (Xu et al. 2015). Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu überprüfen, ob die von Xu et al. im kardialen Gewebe festgestellte Korrelation zwischen *Rasal1*-Promotormethylierung und quantifizierter Herzfibrose auch im peripheren Blut messbar ist und damit das Potenzial zum Biomarker für Herzfibrose besitzt. Damit lauteten die ersten Fragestellungen:

- a) Kann die Korrelation zwischen Fibrosegrad und Rasal1-Promotormethylierung in einem anderen Mausmodell bestätigt werden, das keine AAC, sondern eine AT-II-Applikation zur Fibroseinduktion nutzt?
- b) Korreliert das Ausmaß an Herzfibrose mit im Blut gemessenen Rasal1-Promotormethylierungsleveln?

Die Ca²⁺-ATPase SERCA2 spielt eine Schlüsselrolle in der kardialen Physiologie. Ist ihre Expression reduziert, kann das zu Herzfibrose-assoziierten Erkrankungen wie Herzinsuffizienz führen. Die Erkenntnisse von Kao et al. zur Beeinflussbarkeit der *ATP2A2*-Promotormethylierung durch Hydralazin führten zur Berücksichtigung dieses Gens in den Experimenten dieser Arbeit (Kao et al. 2011). Ob Hydralazin, welches nachweislich zu DNA-Demethylierung führt und sich bei Nierenfibrose bereits als erfolgsversprechende Therapieoption erwiesen hat, auch bei kardialer Fibrose im vorliegenden Mausmodell einen therapeutischen Effekt aufweist und welche Auswirkungen es auf *RASAL1* und *ATP2A2* hat, sollte ebenfalls untersucht werden. Es schlossen sich damit folgende Fragestellungen an:

- c) Spiegelt der Grad an *Atp2a2*-Promotormethylierung das Ausmaß von Herzfibrose wider und wie verhält sich in diesem Kontext die Expression der Isoformen Serca2a und Serca2b?
- d) Wie wirkt sich eine demethylierende Hydralazin-Therapie auf experimentelle Herzfibrose aus und welche Rolle spielt dabei die Rasal1- bzw. Serca2-Expression?
- e) Ist der demethylierende Effekt von Hydralazin auch im Blut anhand der Rasal1- bzw. Atp2a2-Promotormethylierung messbar?

Unter Einbeziehung der Ergebnisse aus dem AT-II-Mausmodell sollte untersucht werden, inwieweit die beobachteten Zusammenhänge auch auf den Menschen zutreffen und ob die DNA-Promotormethylierung Potenzial zum klinisch einsetzbaren Biomarker hat. Dabei sollten Unterschiede innerhalb der untersuchten Patientenkohorten Berücksichtigung finden. Es ergaben sich folgende weitere Fragestellungen:

- f) Sind die im Mausmodell gemachten Beobachtungen auf den Menschen übertragbar?
- g) Welche Patientengruppen werden besonders gut durch etwaige Biomarker-Modelle repräsentiert und könnten von diesen profitieren?
- h) Korrelieren abgesehen vom Ausmaß an Herzfibrose weitere klinische Parameter mit dem Grad an Promotormethylierung der betrachteten Gene RASAL1 und ATP2A2?

2 Material

2.1 Geräte

Analysewaage 1213 Autoklav FVS3 Blot-Kammer Fastblot B44 ChemiDoc MP System Dampfgarer Typ 3216 Elektrische Pipettierhilfe pipetus Flockeneisbereiter AF 80 Fluoreszenzkamera Colorview Gefrierschrank Premium NoFrost Gewebeinfiltrationsautomat TP1020 Inkubator Heratherm Kühlschrank Comfort Kühlzentrifuge 5424 R Magnetrührer IKAMAG RET-G Mastercycler ep gradient S Mikroskop Axiovert S100 TV Mikroskop BX43 Multipette stream Paraffin-Streckbad 1052 Paraffinausgießstation Leica EG1150 H pH-Meter MP220 Pipetten Reference 2 Plattenzentrifuge PerfectSpin P Plattformschüttler Rotamax 120 Real-Time PCR System StepOnePlus **Roller Mixer SRT6** Rotationsmikrotom RM2165 Schüttelwasserbad 1083 Spannungsgerät MS 300V Power Supply Spektralphotometer NanoDrop 2000 Synergy Mx Microplate Reader Thermocycler Thriller Thermomixer comfort TissueLyser LT Trockenschrank

Sartorius, Göttingen, Deutschland Fedegari, Albuzzano, Italien Biometra, Göttingen, Deutschland Bio-Rad Laboratories, Hercules (CA), USA Braun, Kronberg, Deutschland Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland Scotsman Ice Systems, Vernon Hills (IL), USA Olympus, Tokio, Japan Liebherr, Bulle, Schweiz Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA Liebherr, Bulle, Schweiz Eppendorf, Hamburg, Deutschland IKA Werke, Staufen, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland Zeiss, Oberkochen, Deutschland Olympus, Tokio, Japan Eppendorf, Hamburg, Deutschland GFL, Burgwedel, Deutschland Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland Mettler Toledo, Columbus (OH), USA Eppendorf, Hamburg, Deutschland Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland Applied Biosystems, Waltham (MA), USA Stuart, Staffordshire, UK Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland GFL, Burgwedel, Deutschland Major Science, Saratoga (CA), USA Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA BioTek, Winooski (VT), USA Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland Qiagen, Hilden, Deutschland Heraeus, Hanau, Deutschland

Ultrasonic Liquid Processor S-4000 Ultratiefkühlgerät MDF-U54V Vortex-Genie 2 Vortex-Schüttler Lab Dancer Wasseraufbereitungssystem Milly-Q Ref. Wippe Rocky Zentrifuge 5418 Zentrifuge MiniSpin Misonix, Farmingdale (NY), USA Sanyo, Moriguchi, Japan Bender & Hobein, Zürich, Schweiz VWR International, Radnor (PA), USA Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland Fröbel Labortechnik, Lindau, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.2 Software

cell^D	Olympus, Tokio, Japan
cellSens dimension 1.6	Olympus, Tokio, Japan
Gen5	BioTek, Winooski (VT), USA
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, La Jolla (CA), USA
Illustrator CS5	Adobe, San José (CA), USA
Image Lab	Bio-Rad Laboratories, Hercules (CA), USA
ImageJ	NIH, Bethesda (MD), USA
MS Office	Microsoft, Redmond (WA), USA
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA
Photoshop CS6	Adobe, San José (CA), USA
StepOnePlus Software 2.3	Applied Biosystems, Waltham (MA), USA

2.3 Gebrauchsmaterialien

Adhäsionsobjektträger SuperFrost Plus	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Biopsie-Einbettkassetten Rotilabo	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bis-Tris-Gel NuPAGE 4-12 % (1,5 mm, 15- <i>well</i>)	Novex, Life Technologies, Carlsbad (CA), USA
Dako Pen S2002	Dako, Agilent Technologies, Santa Clara (CA), USA
Deckgläser 24 x 40/60 mm	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Einmal-Pinzetten	Servoprax, Wesel, Deutschland
Einmal-Skalpelle, No. 22	Feather Safety Razor, Osaka, Japan
Elektrophorese-Kammer XCell SureLock Mini-Cell	Novex, Life Technologies, Carlsbad (CA), USA
Filterpapier Model 583 Gel Dryer	Bio-Rad Laboratories, Hercules (CA), USA
Filterspitzen Biosphere (10, 100, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Filterspitzen TipOne (10, 200, 1000 µl)	Starlab International, Hamburg, Germany
Gefäße Safe Lock Tubes (1,5 & 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

MicroAmp Fast 8-Tube Strip (0,1 ml) MicroAmp Fast Optical 96-*well* Reaction Plate (0,1 ml) MicroAmp Optical Adhesive Film Mini-Osmotic Pump (Modelle 1002 & 1004) Monofilament Prolene 8707H 6-0 (75cm) Nitrozellulose-Blotting-Membran Amershan Protran, Porengröße 0,45 µm Nunc Kryoröhrchen (1,8 ml) Parafilm M Pipettenspitzen Biosphere (10, 100, 1000 µl) Pipettenspitzen MultiFlex (200 µl) Pipettenspitzen TipOne (10, 200, 1000 µl) Stainless Steel Beads (5 mm) Zentrifugenröhrchen, konisch (15 & 50 ml)

Applied Biosystems, Waltham (MA), USA Applied Biosystems, Waltham (MA), USA Applied Biosystems, Waltham (MA), USA Alzet, Durect, Cupertino (CA), USA Ethicon, Somerville (NJ), USA GE Healthcare, Little Chalfont, UK

Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA Bemis, Neenah (WI), USA Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland Sorenson Bioscience, Salt Lake City (UT), USA Starlab International, Hamburg, Germany Qiagen, Hilden, Deutschland Falcon, Corning, Corning (NY), USA

2.4 Kitsysteme

Ambion PureLink RNA Mini Kit	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad (CA), USA
DNase I	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Methylamp Methylated DNA Capture (MeDIP) Kit	Epigentek, Farmingdale (NY), USA
MethylFlash Methylated DNA 5-mC Quantification Kit (Colorimetric)	Epigentek, Farmingdale (NY), USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA
SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad (CA), USA
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA
Trichrom Stain (Masson) Kit	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Vectastain Universal Elite ABC HRP Kit	Vector Laboratories, Burlingame (CA), USA
Weigert's iron hematoxylin solution Set	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA

2.5 Chemikalien, Reagenzien und Wirkstoffe

2-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
AEC Substrate Chromogen	Dako, Agilent Technologies, Santa Clara (CA), USA
Albumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ambion RNaseZap	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad (CA), USA
Ambion TRIzol Reagent	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad (CA), USA
Angiotensin-II (A9525)	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA

Bouin's Solution	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Chloroform (Trichlormethan) EMSURE	Merck, Darmstadt, Deutschland
cOmplete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free	e Roche, Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
dNTP Mix (10 mM)	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad (CA), USA
Dulbecco's PBS	Gibco, Life Technologies, Carlsbad (CA), USA
Entellan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure (100 %)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol ROTIPURAN (\geq 99,8 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fast SYBR Green Master Mix	Applied Biosystems, Life Tech., Carlsbad (CA), USA
Forene 100 % (V/V), Wirkstoff Isofluran	AbbVie, North Chicago (IL), USA
Formaldehydlösung Roti-Histofix (4 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Heparin-Rotexmedica (25000 I.E./5 ml)	Rotexmedica, Trittau, Deutschland
Hydralazin-Hydrochlorid (H1753)	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Novex Sharp Pre-stained Protein Standard	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad (CA), USA
NP-40 Cell Lysis Buffer	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad (CA), USA
Nuclease-free Water	Qiagen, Hilden, Deutschland
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad (CA), USA
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20x)	Novex, Life Technologies, Carlsbad (CA), USA
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad (CA), USA
Perjodsäurelösung 1 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pierce Fast Semi-Dry Transfer Buffer (10x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA
RNase OUT Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad (CA), USA
Schiff's reagent	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Shandon Immu-Mount	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA
Target Retrieval Solution (pH 6)	Dako, Agilent Technologies, Santa Clara (CA), USA
TRIS PUFFERAN (≥ 99,9 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid ROTIPURAN (30 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol (Isomere) (≥ 98,5 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.6 Puffer und Lösungen

2.6.1 Allgemeine Puffer

<u>10x PBS (mit HCl auf pH 7,25 titriert)</u>	
NaCl	80 g
KCl	2 g

$Na_2HPO_4 \ge 2 H_2O$	11,5 g	
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	2 g	
ddH ₂ O	aufgefüllt bis 1000 ml	
<u>10x TBS</u>		
NaCl	87,6 g	
TRIS	60,5 g	
ddH ₂ O	aufgefüllt bis 1000 ml	
<u>TRIS-EDTA (TE)</u>		
TRIS (1 M)	1 ml	
TRIS	24,2 g	
ddH ₂ O	200 mi	
EDTA (0,5 M)	200 µl	
ddH2O	29,2 g 200 ml	
444.0	09.9 ml	
uuп ₂ О	90,0 1111	

2.6.2 Puffer und Lösungen für Western Blot

<u>Lysepuffer</u>	
Proteaseinhibitor (cOmplete ULTRA Tablets)	1 Tablette
NP-40 Cell Lysis Buffer	10 ml
<u>Probenpuffer</u>	
NuPAGE LDS Sample Buffer	200 µl
2-Mercaptoethanol	80 µl
ddH2O	180 µl
Elektrophorese-Innenpuffer	
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20x)	50 ml
2-Mercaptoethanol	1 ml
ddH ₂ O	9949 ml
<u>Elektrophorese-Außenpuffer</u>	
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20x)	50 ml
ddH ₂ O	9950 ml
Transferbuffer	
Pierce Fast Semi-Dry Transfer Buffer (10x)	2,5 ml
ddH ₂ O	42,5 ml

<u>1× TBS Tween (TBST)</u>	
TBS	100 ml
Tween 20	1 ml
ddH ₂ O	899 ml
<u>Blocklösung</u>	
Milchpulver	2,5 g
TBST	50 ml
<u>Antikörper-Puffer</u>	
Milchpulver	1 g
TBST	50 ml
2.6.3 Puffer und Lösungen für histologischer Auflicher und Lösungen für histologischer Auflicher	che Färbungen
<u>Citratpuffer</u>	
Target Retrieval Solution (pH 6)	10 ml
ddH ₂ O	90 ml
<u>Blocklösung (Immunfluoreszenz-Färbung)</u>	
Albumin Franktion V	0,5 g
PBS	aufgefüllt bis 50 ml
<u>Peroxidase-Blocklösung (Immunhistochemie-Färbung)</u>	
Wasserstoffperoxid ROTIPURAN (30 %)	10 ml
ddH ₂ O	990 ml

2.7 Oligonukleotide (Primer)

Tabelle 1: Primer für die Quantifizierung der mRNA-Expression durch qRT-PCR. Hersteller: PrimerDesign, Southampton, UK.

Ziel-mRNA	Primersequenz	Spezies
<i>Atp2a2</i> (Isoform A) F	TCAGAGAGCCTCTCCAGAGAAG	Mus Musculus
Atp2a2 (Isoform A) R	GCCACTTACAACTGAAGGCATG	Mus Musculus
Atp2a2 (Isoform B) F	AGTCCTGCTACCTCAGTCAGTA	Mus Musculus
Atp2a2 (Isoform B) R	CCTCTCGTGAAGACGGATGTAA	Mus Musculus

Gapdh F	vom Hersteller nicht offengelegt	Mus Musculus
Gadph R	vom Hersteller nicht offengelegt	Mus Musculus

Tabelle 2: Primer für die Quantifizierung der Promotormethylierung durch qRT-PCR.Hersteller:Microsynth, Balgach, Schweiz.

Ziel-mRNA	Primersequenz	Spezies
Rasal1 F	GCCGAGGGCTCAAAACTGAG	Mus Musculus
Rasal1 R	GCGGAGGCTCCCACGTCACCGGC	Mus Musculus
Atp2a2 F	CCAATGCGCGGTCCCAGCCAG	Mus Musculus
<i>Ap2a2</i> R	CCTCTGCGTCCACGCTGTGC	Mus Musculus
RASAL1 F	GCCAACTCACCAGGAGCCAGCGGC	Homo sapiens
RASAL1 R	CTACCGGCACCCCAGTCATGCGC	Homo sapiens
<i>ATP2A2</i> F	GGGCCCAGAACCCGCTGGGG	Homo sapiens
ATP2A2 R	GGAGCTGGGAGCGCGGTCCAC	Homo sapiens

2.8 Antikörper

Tabelle 3: Antikörper für Western Blot, Immunhistochemie- und Immunfluoreszenzfärbungen. In den oben genannten Kitsystemen enthaltene Antikörper sind nicht aufgeführt.

Name & Spezifikationen	Spezies	Hersteller	Verwendung & Verdünnung
Anti-Rasal1, IgG, polyklonal (Katalognr.: orb30469)	Kaninchen	Biorbyt, Cambridge, UK	IHC: 1:100 WB: 1:1000
Anti-Serca2, IgG, monoklonal (Katalognr.: ab2861)	Maus	Abcam, Cambridge, UK	IHC: 1:100 WB: 1:1000
Anti-Serca2a-Serum, polyklonal (Katalognr.: A010-20)	Kaninchen	Badrilla, Leeds, UK	WB: 1:5000
Anti-Serca2b-Serum, polyklonal (Katalognr.: A010-24S)	Kaninchen	Badrilla, Leeds, UK	IHC: 1:200 WB: 1:5000
Anti-Kollagen-1, IgG, polyklonal (Katalognr.: ab34710)	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK	IF: 1:200
Anti-Gapdh, IgG, monoklonal (Katalognr.: 5G4)	Maus	HyTest, Turku, Finnland	WB: 1:5000
Alexa Fluor 488, IgG, polyklonal, Anti-Kaninchen (Katalognr.: A-21206)	Esel	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad (CA), USA	IF: 1:200
HRP-konjugiertes IgG, polyklonal, Anti-Maus (Katalognr.: P 0160)	Kaninchen	Dako, Agilent Technologies, Santa Clara (CA), USA	WB: 1:2000

2.9 Murines und humanes Untersuchungsmaterial

2.9.1 Murine Gewebe- und Blutproben

Als Versuchstiere dienten 12-21 Wochen alte männliche und weibliche Wildtyp-Mäuse mit C57BL/6J-Hintergrund. Sie wurden im *European Neuroscience Institute Göttingen* (ENI) untergebracht und von Tierpflegern/ -ärzten der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) versorgt. Ihre Haltung erfolgte in Käfigen bei konstanter Umgebungstemperatur und Luftfeuchtigkeit. Ein Tag-Nacht-Rhythmus wurde durch zwölfstündige Hell-Dunkel-Zyklen simuliert. Wasser und Nahrung wurden jeweils nach 48 Stunden ausgewechselt.

Die Tierschutzkommission der UMG und das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVIS) erteilten die nötige Genehmigung für die Forschung an den Versuchstieren (Antragsnummer: G16/2176).

2.9.2 Humane Vollblutproben der HOCM-Patientenkohorte

Um den Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und kardialer Fibrose zu untersuchen, wurden Messungen an Vollblutproben von 38 Patienten mit hypertroph-obstruktiver Kardiomyopathie (HOCM) durchgeführt. Die Proben wurden von Herrn Prof. Dr. Borggrefe, Direktor der Klinik für Kardiologie der Universitätsmedizin Mannheim, zur Verfügung gestellt und von der dortigen Ethikkommission für die medizinische Forschung freigegeben (Antragsnummer: 2006-069N-MA). Die Ethikkommission der UMG erteilte die obligate Genehmigung für die Forschung im Rahmen der vorliegenden Arbeit (Antragsnummer: DOK_145_2016).

3 Methoden

3.1 Mausstudie

3.1.1 Tiermodell

Die Induktion von kardialer Fibrose im Mausmodell wurde mittels AT-II-Applikation realisiert. Dabei wurden als profibrotische Effekte die Angiotensin-Rezeptorbindung mit konsekutiver peripherer Vasokonstriktion und Nachlasterhöhung des Herzens sowie die TGF-β1-Modulation genutzt (s.o.). Dieses Modell verwendeten auch andere Gruppen schon zur Induktion von Fibrose und kardiomyozytärer Hypertrophie (Matsui et al. 2004; Schellings et al. 2010). Die AT-II-Applikationsdauer bei je einer Tierkohorte betrug zwei und vier Wochen. Bei einer weiteren Kohorte wurde der therapeutische Effekt von Hydralazin untersucht, welches vier Wochen lang intraperitoneal verabreicht wurde. Kontrolltiere wurden für dieselbe Zeitdauer der korrespondierenden Kohorte mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) behandelt.

3.1.2 Wirkstoffdosierung und -applikation

Versuchstieren der AT-II-Kohorten wurde das Hormon in einer Konzentration von 10 mg/ml bei einer Dosis von 2,16 mg/kg KG/Tag appliziert (Schellings et al. 2010). Um eine konstante Applikationsrate zu gewährleisten, wurden osmotische Minipumpen verwendet. Es kamen die Modelle 1002 und 1004 der Firma Alzet zum Einsatz, welche für eine Abgabedauer von zwei bzw. vier Wochen konzipiert sind. Die Abgaberate des 2-Wochen-Modells betrug 0,25 µl/h bei einem Fassungsvolumen von 100 µl und die des 4-Wochen-Modells 0,11 µl/h bei 200 µl. Pumpen für die Kontrolltiere wurden mit 100 µl bzw. 200 µl PBS befüllt. Bis zur Implantation wurden alle Pumpen bei 37°C in PBS gelagert.

Die Funktion der Pumpen ist aus ihrem Aufbau ersichtlich: Eine äußere semipermeable Membran umgibt eine NaCl-Lösung, welche durch eine zweite semipermeable Membran vom Füllraum getrennt ist. Durch eine osmotische Druckdifferenz gelangt Flüssigkeit aus dem umliegenden Gewebe in das NaCl-Kompartiment, dessen Volumen in der Folge zunimmt und auf den Füllraum drückt. Nun kann der Wirkstoff aus einer kleinen Öffnung am Pumpenpol austreten, die sonst durch den Kapillareffekt verschlossen bleibt.

Den Tieren der Therapie-Kohorte wurde zusätzlich über vier Wochen Hydralazin einer Dosis von 5 mg/kg KG/Tag intraperitoneal gespritzt. Als Orientierung diente die Arbeit von Tampe et al. (Tampe et al. 2014a). Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die gewählte Dosierung keinen blutdrucksenkenden Effekt bei Wildtyp-Mäusen aufweist (Tampe et al. 2017). Und auch bei der hier verwendeten Kohorte wurde zuvor sichergestellt, dass nicht Blutdruckmodulation für die potenziell therapeutische Wirkung von Hydralazin bei Herzfibrose verantwortlich war (**Abbildung 8**).



Abbildung 8: Blutdruck und Herzfrequenz unter Hydralazin-Einfluss im AT-II-Mausmodell. Absolute Messwerte in mmHG bzw. bpm im Vergleich zwischen Hydralazin- und Kontrollgruppe. Abkürzungen: AT2 (Angiotensin II), LDHydra (*low dose*-Hydralazin). (* p<0,05, ** p<0,01, # keine Signifikanz.) *Daten und Abb. von Herrn Dr. Tampe, unpubliziert.*

3.1.3 Operation, Sektion und Präparation der Versuchstiere

Die präoperative Analgesie im Rahmen der Pumpenimplantation erfolgte durch die subkutane Injektion von Buprenorphin (0,1 g/kg KG, 1:10 mit 0,9 % NaCl verdünnt). Als Narkotikum diente Isofluran, welches den Mäusen in Bauchlage inhalativ über ein Schlauchsystem verabreicht wurde. Die Pumpen wurden in eine subkutane Tasche zwischen den Schulterblättern eingebracht, welche nach Rasur und Desinfektion des OP-Gebiets durch eine Hautinzision und der Trennung von Hautund Muskelgewebe geformt wurde. Abschließend erfolgte ein zweischichtiger Wundverschluss. Präund postoperativ wurde den Mäusen über das Trinkwasser Novaminsulfon (500 mg/ml Tropfen, 15 Tropfen pro 250 ml) zur analgetischen Behandlung verabreicht.

Die Operationen wurden von Herrn Dr. Björn Tampe (Klinik für Nephrologie und Rheumatologie, Universitätsmedizin Göttingen) durchgeführt.

Am 14. bzw. 28. postoperativen Tag wurden die Versuchstiere durch Frau Sarah Rinkleff mit Isofluran narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. In Rückenlage der Mäuse erfolgte eine abdominelle und thorakale Längslaparotomie. Die linke Nierenarterie wurde lokalisiert und durchtrennt, das in den Bauchraum fließende Blut durch eine mit Heparin präparierte Spritze aufgefangen und in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt. Anschließend wurde das Herz entnommen und durch mittigen Querschnitt beider Ventrikel zerteilt. Die eine Hälfte wurde in ein Kryoröhrchen gegeben und in flüssigem Stickstoff gekühlt, die andere Hälfte wurde in Biopsie-Kassetten zur Fixierung in vierprozentigem Formaldehyd eingelegt. Die langfristige Aufbewahrung von Blut und Kryoröhrchen erfolgte bei -80 °C.

3.2 Proteinbiologische Methoden

3.2.1 Proteinisolation

Mit dem Skalpell wurde je ein Herzgewebestück einer Größe von ca. 5-10 mm³ abgetrennt und in ein 2 ml-Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend wurden 350 µl des zuvor mit Proteaseinhibitor ("cOmplete ULTRA Tablets") versetzten NP40-Lysepuffers hinzugefügt. Im "Tissue Lyser LT" wurde das Gewebe für fünf Minuten bei 50 Hz lysiert. Das Lysat wurde anschließend in ein 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt und viermal im Abstand von zehn Minuten mithilfe des "Vortex" kräftig durchmischt, um einen möglichst vollständigen Gewebeaufschluss zu erreichen. Schließlich wurde der Gefäßinhalt bei 4 °C für 15 Min. bei 12000 U/Min. zentrifugiert, sodass sich der Detritus am Boden absetzen konnte. Das Protein war nun im Überstand gelöst, welcher in ein leeres 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt und bei -80 °C konserviert wurde.

3.2.2 Proteinkonzentrationsmessung

Um das gelöste Protein für weiterführende proteinbiologische Methoden verwenden zu können, musste zunächst seine Konzentration bestimmt werden. Diesem Zweck diente das "Pierce BCA Protein Assay Kit", welches Konzentrationsunterschiede von Proteinen in Lösung durch eine kolorimetrische Reaktion spektralphotometrisch messbar macht und eine Weiterentwicklung der Lowry-Methode darstellt (Lowry et al. 1951). In alkalischer Umgebung formen Peptide mit mindestens drei freien Aminogruppen einen leicht blau-violetten Komplex mit freien Cu²⁺-Ionen, welche im Verlauf zu Cu⁺-Ionen reduziert werden. Diese erste Reaktion ist auch als Biuret-Reaktion bekannt. In einem zweiten Schritt bildet Cu⁺ mit je zwei Molekülen Bicinchoninsäure (BCA) einen stark blau-violetten wasserlöslichen Komplex, dessen Farbintensität proportional von der Menge an Protein abhängt – insbesondere von der Anwesenheit der vier Aminosäuren Cystein, Cystin, Tyrosin und Tryptophan, welche zur Cu²⁺-Reduktion beitragen. Bei einem Absorptionsmaximum von 562 nm kann die optische Dichte und mithilfe einer Eichkurve damit auch die Proteinkonzentration im Spektralphotometer gemessen werden.

Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen von Rinderserumalbumin (BSA) erstellt, welche später der Erstellung der Eichkurve diente. Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1:10 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Es wurde dann eine Lösung der Kit-Reagenzien A und B im Verhältnis 50:1 hergestellt. Je 200 µl dieser Lösung wurden zu 25 µl der Eichlösungen sowie des verdünnten Proteins gegeben und sodann für 30 Min. bei der optimalen Reaktionstemperatur von 37 °C inkubiert. Nach einer zehnminütigen Kühlung bei 4 °C konnte die optische Dichte der nun sichtbar verfärbten Proben mit dem "NanoDrop 2000" gemessen werden. Die Konzentration wurde mithilfe der zuvor erstellten Eichkurve ermittelt.

3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um später im Western Blot bestimmte Proteine von anderen distinguieren zu können, wurden die Proteinproben mithilfe der SDS-PAGE nach ihrer Molekülmasse geordnet diskontinuierlich
aufgetrennt (Laemmli 1970). Am Minimum orientiert wurden dafür zunächst Konzentration und Volumen aller Proben angeglichen, sodass eine Gesamtmenge von 35 µg Protein in einem Volumen von 12,5 µl gelöst waren. Zu diesem wurden 12,5 µl des präparierten Probenpuffers hinzugegeben. Das darin enthaltene 2-Mercaptoethanol diente der Aufspaltung von Disulfidbrücken. Zur Denaturierung der Proteine, der Lösung von Sekundär- und Tertiär-Molekülstrukturen sowie zum Aufbruch von Wasserstoffbrückenbindungen wurden die Proben fünfminütig bei 95 °C inkubiert. Das ebenfalls im Puffer enthaltene anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) hat die Eigenschaft, die verschieden starken Eigenladungen der Proteine zu maskieren, sodass alle Aminosäureketten letztendlich konstant negativ geladen vorlagen. Für ihre Auftrennung wurden Bis-Tris-Gele (4-12 %) eingesetzt, deren präformierte Taschen mit je 25 µl Probenvolumen gefüllt wurden; außerdem wurde ein farbiger Proteinstandard zur späteren Abschätzung der Molekularmasse Das Gel, eingesetzt in eine mit Innenhinzugefügt. und Außenpuffer befüllte Elektrophoresekammer, wurde einem vertikalen Spannungsfeld ausgesetzt. Es wurde zunächst für 15 Min. eine Spannung von 80 V angelegt und anschließend für 90 Min. auf 120 V erhöht. Die negativ geladenen Proteine näherten sich der Anode. Da ihre Eigenladung zuvor durch das SDS aufgehoben worden war, erfolgte die Auftrennung ausschließlich nach Größe bzw. Molekularmasse.

3.2.4 Western Blot: Proteintransfer und Immundetektion

Der Western Blot dient dem qualitativen sowie quantitativen Nachweis von Proteinen. Das eigentliche "*Blotting*" bezeichnet die Übertragung der im Gel elektrophoretisch getrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran durch Anlegen eines gerichteten elektrischen Feldes. Dieser Vorgang wird auch als Elektrotransfer bezeichnet. Zu diesem Zweck wurde eine Blot-Kammer verwendet, welche die Generierung eines elektrischen Feldes senkrecht zum Gel erlaubte. Basierend auf dem *Semidry*-Western Blot-Prinzip wurden drei Filterpapiere übereinander auf die Anode der Kammer gelegt. Darauf wurde zunächst die Nitrozellulosemembran platziert, dann folgten das Elektrophorese-Gel sowie drei weitere Filterpapiere. Membran und Filterpapiere wurde zuvor mit Transferpuffer durchtränkt, um optimale elektrische Leit- und Transferbedingungen zwischen den Elektrozellulosemembran wanderten, von der sie durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden wurden. Sie bewegten sich dabei in nur einer Dimension und behielten damit auch auf der Membran ihre Konfiguration bei. Für den einstündigen Elektrotransfer wurde die Blot-Kammer an ein Netzteil angeschlossen und ein Strom von 150 mA angelegt, der nach 15 Min. auf 250 mA erhöht wurde.

Um Vorhandensein und Menge der gesuchten Proteine später optisch sichtbar machen zu können, wurde die Membran im Folgenden mit Antikörpern behandelt, die sich spezifisch gegen die zu analysierenden Proteine richteten. Freie, unbesetzte Membranbindungsstellen wurden zunächst durch die einstündige Blockierung in fünfprozentiger Milch von Milcheiweißen besetzt, welche eine spätere Bindung kontaminierender Proteinen und somit eine unspezifische Antikörperbindung gegen diese verhinderten. Danach erfolgte bei 4 °C über Nacht die Inkubation mit dem jeweiligen

Primärantikörper, nachdem dieser in zweiprozentiger Milch gelöst worden war (Verdünnungen siehe **Tabelle 3**). Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal fünfminütig mit TBST gewaschen, bevor sie eine Stunde lang mit dem in zweiprozentiger Milch gelösten Sekundärantikörper behandelt wurde. Dieser war mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt und richtete sich gegen den F_c-Teil der Primärantikörper. Damit entsprach die Menge der gebundenen Antikörper proportional der Menge des vorhandenen Proteins.

Im letzten Schritt, der Immundetektion, wurden die Antikörper-markierten Proteine durch eine Chemolumineszenzreaktion sichtbar gemacht. Dies geschah mit dem "SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate", dessen Komponenten Luminol und Peroxidase in dunkler Umgebung zu gleichen Teilen auf die Membran gegeben wurden. Die gebundene HRP katalysierte nun die Reaktion beider Stoffe zum angeregten Zwischenprodukt 3-Aminophthalat. Dieses zerfiel in einen energetisch niedrigeren Zustand und gab dabei Energie in Form von Photonen ab, welche mithilfe des "ChemiDoc MP Systems" inklusive der Software "Image Lab" detektiert werden konnten. Die Stärke des Lichts - also die Intensität der Banden - entsprach proportional der Proteinmenge und konnte durch eine Dichteanalyse mithilfe des Programms "ImageJ" ermittelt werden. Normalisiert wurden die errechneten Werte zur Expression des Housekeeping-Proteins Gapdh der jeweils selben Probe. Dazu wurde die Membran nach ihrer Entwicklung eine Stunde lang mit dem "Restore Western Blot Stripping Buffer" behandelt, um alle gebundenen Antikörper zu entfernen. Danach erfolgte analog zum initialen Prozedere - die Blockierung der Membran, die Inkubation mit dem Gapdh-Antikörper inklusive entsprechendem Sekundärantikörper sowie die abschließende Chemolumineszenz-Entwicklung.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 DNA-Isolation

Als Ausgangsmaterial verschiedener weiterführender Experimente war genomische DNA erforderlich. Die Extraktion wurde mithilfe des "DNeasy Blood & Tissue Kit" (Qiagen) auf Grundlage einer Spin-Säulen-basierten Aufreinigung durchgeführt. Hierbei bindet die in einem Lysat befindliche DNA im Beisein chaotroper Puffer unter optimerten pH-Bedingungen an Siliciumdioxid (Silikagel) im Inneren der Säule. Das Prinzip basiert auf insgesamt vier Schritten: 1. Proben-Lysis, 2. DNA-Bindung an das Silikagel, 3. Waschung, 4. DNA-Elution.

Ausgangsmaterial der Folgeexperimente war DNA zum einen aus murinem Herzgewebe, zum anderen aus murinem sowie humanem Vollblut. Das Mäuseblut wurde bei Entnahme heparinisiert, das Humanblut in EDTA-Röhrchen gesammelt.

Zur Lysis der Gewebeprobe wurden ein Gewebestück von 5-10 mm³ und 200 µl AL-Puffer in ein 2 ml-Eppendorf-Gefäß gegeben und drei Minuten lang bei einer Amplitude von 50 Hz im "Tissue Lyser LT" lysiert. Nach Überführung in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß wurden 200 µl AL-Puffer sowie 20 µl Proteinase K zum Lysat zum weiteren Gewebeaufschluss und zur Spaltung von Peptidbindungen hinzugegeben und bei 56 °C für 10 Minuten inkubiert.

Die Lysis der Blutproben differierte insofern, als dass 100-200 µl Vollblut (mit PBS ggf. zur Summe 200 µl aufgefüllt) zu 20 µl Proteinase K und 200 µl AL-Puffer in ein 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß gegeben und anschließend bei 56 °C inkubiert wurden. Der mechanische Aufschluss durch den "Tissue Lyser LT" war hier nicht vonnöten.

In beiden Fällen wurden nun 200 μ l reines Ethanol addiert und das Gemisch anzentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils auf eine Spin-Säule übertragen und diese bei 6000 ×g für eine Minute zentrifugiert. Alle Zentrifugationen fanden bei Raumtemperatur statt. Nach Entsorgung des Durchflusses wurden erst 500 μ l des Ethanol-haltigen Waschpuffers AW1 und nach nochmaliger Zentrifugation (abermals eine Minute bei 6000 ×g) 500 μ l des Waschpuffers AW2 auf die Säule pipettiert. Es folgte eine dreiminütige Zentrifugation bei 20000 ×g. Die Säule wurde auf ein leeres 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß transferiert; anschließend wurden 65 μ l des AE-Elutions-Puffers auf die Säule gegeben. Nach einminütiger Inkubation wurde die DNA bei einer Zentrifugation von einer Minute bei 6000 ×g eluiert. Dieselbe Prozedur wurde mit 50 μ l des AE-Puffers und einem neuen 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß wiederholt, bevor beide finalen 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße bei -20 °C zur weiteren Verwendung eingefroren wurden und die Säule verworfen wurde. Die zweimalige Elution stellte ein reines und hoch konzentriertes erstes Eluat einerseits und ein weniger reines und geringer konzentriertes zweites Eluat andererseits sicher, welches bei Bedarf hoher Volumina als Reserve dienen konnte.

3.3.2 Nukleinsäuren-Konzentrationsmessung

Die Konzentrationsmessungen von DNA bzw. RNA wurden mithilfe des Geräts "NanoDrop 2000" (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt, welches auf dem Prinzip der Spektralphotometrie beruht. Das Instrument wurde computergestützt mit der "Nano Drop 2000/2000c Operating Software" kontrolliert. Bei einer Messung wurde jeweils 1 µl des jeweiligen Probenvolumens auf den Messkontakt des Gerätesockels aufgetragen und anschließend ein Hebelarm auf den Sockel gesenkt. Die Probe überbrückte nun die Enden zweier Glasfaserkabel, die im Messkontakt sowie im Hebelarm integriert waren. Ein CCD-Sensor des Spektralphotometers, der auf dem inneren lichtelektrischen Effekt der Silicium-Bauteile des Sensors basiert, detektierte dann mit einer Xenon-Blitzlampe als Lichtquelle die durch die Probe tretende Lichtintensität. Als Referenzwert diente jeweils eine Leermessung mit demjenigen Puffer, in dem die Nukleinsäure gelöst vorlag. Im Falle der DNA war dies AE-Puffer, bei RNA Nuklease-freies Wasser. Die Absorption wurde durch die Software nach folgender Formel errechnet:

$$E_{\lambda} = -\log \frac{I_{Probenmessung}}{I_{Leermessung}}$$

Durch das Lambert-Beersche Gesetz konnte dann die Stoffmengenkonzentration der Probe ermittelt werden.

$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$

 E_{λ} : Extinktion (Absorption für Licht der Wellenlänge λ)

IProbenmessung: Intensität des durch die Nukleinsäuren-Probe getretenen Lichts

ILeermessung: Intensität des durch den Lösungspuffer getretenen Lichts

 ε_{λ} : Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ

c: Stoffmengenkonzentration der absorbierenden Substanz (Nukleinsäure)

d: Schichtdicke der durchstrahlten Probe

Die Formel wurde angeglichen, sodass die Endkonzentration in einer dem Probenvolumen angemessenen Einheit [ng/µl] ausgedrückt werden konnte. Als Maß für die Reinheit der isolierten Nukleinsäuren wurde das Verhältnis der Absorption bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm dargestellt. Das Optimum bei DNA-Konzentrationsmessungen lag bei einem Verhältnis von ~1,8. Bei RNA war ein entsprechender Wert von ~2,0 zu erwarten. Eine wesentliche Abweichung wäre durch die Probenverunreinigung zum Beispiel von Proteinen oder Phenol zu erklären gewesen.

3.3.3 RNA-Isolation

Die RNA-Extraktion aus murinem Herzgewebe erfolgte mithilfe des "Purelink RNA Mini Kits", wobei der zu Anfang durchgeführte Gewebeaufschluss und die Zelllysis vom Kit-Herstellerprotokoll differierten. Das Verfahren beruht auf der "*Single-Step*"-Methode (Chomczynski und Sacchi 1987).

Zu Beginn wurde mithilfe eines Skalpells ein aus der Maussektion gewonnenes Gewebestück von ca. 5 mm3 in ein 2 ml-Eppendorf-Gefäß gegeben. Hinzu kam jeweils 1 ml "TRIzol Reagent". Das Gewebe wurde dann bei 50 Hz für 5 Min. mithilfe des "Tissue Lysers LT" mechanisch homogenisiert und das Lysat anschließend in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt. Das verwendete Trizol enthält Guanidiniumthiocyanat und Phenol; ersteres dient der Zelllysis und gleichzeitigen der Inaktivierung von RNasen, in letzterem kann sich RNA lösen. Dem Lysat wurden 200 ul Chloroform hinzugegeben, bevor das Gefäß dann für ca. 15 Sek. geschüttelt wurde. Eine anschließende Zentrifugation von 12000 U/Min. für 15 Min. bei 4 °C führte zur Phasentrennung des Gefäßinhalts. Bei dieser Methode enthält die untere Chloroformphase Proteine, die Interphase besteht aus DNA und in der wässrigen Oberphase ist RNA gelöst. Vorsichtig wurden 400 µl der wässrigen Phase in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt, mit derselben Menge 70% igen Ethanols versetzt und durch Resuspension gemischt. 500 µl dieser Lösung wurden daraufhin auf die Silikagel-Membran einer Spin-Säule des Kits gegeben und anschließend bei 12000 U/Min. für 15 Sek. zentrifugiert. Durch polare Wechselwirkungen fand dabei unter den Nukleinsäure-fällenden Pufferbedingungen des Ethanols eine Adsorption der RNA an die Silikagel-Membran statt. Es schlossen sich verschiedene Waschschritte mit den dafür vorgesehenen Kit-Komponenten an. Nach Zugabe von 700 µl des Waschpuffers I und erneuter Zentrifugation von 12000 U/Min. für 15 Sek. erfolgte die zweimalige Zugabe des Waschpuffers II, jeweils gefolgt von Zentrifugationen derselben Drehzahl

sowie Dauer. Eine sich anschließende weitere Zentrifugation von einer Minute bei 12000 U/Min. galt der Trocknung des Silikagels. Nach Zugabe von 50 µl Nuklease-freien Wassers und einer Inkubationszeit von einer Minute erfolgte die abschließende Elution in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß bei einer zweiminütigen Zentrifugation von 12000 U/Min. Die gelöste RNA wurde bei -80 °C aufbewahrt.

3.3.4 DNA-Verdau

Zur sicheren Elimination jeglicher DNA-Kontamination in den RNA-Proben wurden diese einer Behandlung mit Desoxyribonuklease I (DNase I) unterzogen.

Anfangs wurden dafür (orientiert an der niedrigsten gemessenen RNA-Konzentration der jeweiligen Kohorte) 180 - 500 ng RNA in ein 0,2 ml-PCR-Gefäß überführt und bis zu einem Volumen von 8 µl mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt. Pro Gefäß wurden je 1 µl DNase I und 10-fach konzentrierter Reaktionspuffer hinzugefügt. Nach kurzer Mischung wurden die Proben bei Raumtemperatur für 15 Min. inkubiert. Um die DNase I wieder zu inaktivieren, wurde dann jeweils 1 µl des Stop-Puffers addiert und die Mischung für 10 Min. bei 70 °C im "Mastercycler ep gradient S" inkubiert. Die RNA-Probengefäße wurden auf Eis gestellt und waren somit bereit für den nächsten Schritt, der Umschreibung in cDNA.

3.3.5 cDNA-Synthese

Die Umschreibung von mRNA zu rekombinanter DNA (cDNA) erfolgte in Anlehnung an das Herstellerprotokoll der "SuperScript II Reverse Transcriptase" und mithilfe der dort beschriebenen Reagenzien. Für alle Temperaturwechsel im Laufe des Protokolls wurde der "Mastercycler ep gradient S" benutzt.

RNA besteht aus ribosomaler RNA (rRNA), Transfer-RNA (tRNA) und nur zu etwa 1-5 % aus der für die Umschreibung bedeutsamen messenger RNA (mRNA). Diese Verhältnisse waren auch bei der extrahierten und aufgereinigten RNA zu erwarten. Es wurden zu Beginn je Probengefäß 1 µl Oligo(dT)-Primer und 1 µl dNTP-Mix hinzugefügt. Die Oligo(dT)-Primer sind spezifisch für mRNA, da sie an das poly(A)-Segment der mRNA binden – es wurde also sichergestellt, dass ausschließlich mRNA amplifiziert wurde. Der dNTP-Mix lieferte die vier natürlichen Desoxyribonukleosidtriphosphate zu gleichen Teilen. Nach einer Inkubation von 65 °C für 5 Min. und anschließender Kühlung bei 4 °C wurden in jedes Gefäß 4 µl 5x First-Strand-Puffer, 2 µl Dithiothreitol (DTT) und 1 µl RNaseOut pipettiert, nachdem für diese Reagenzien ein Mastermix vorbereitet wurde. Bei der folgenden zweiminütigen Inkubation von 42 °C konnte die RNaseOUT als rekombinanter RNase-Inhibitor endogene Pankreas-RNasen nicht-kompetitiv hemmen. Als letzter Zusatz wurde abschließend je 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase zu den Proben gegeben, sodass bei der folgenden Inkubation von 50 Min. bei 42 °C die Umschreibung der mRNA in Erststrang-cDNA vollzogen werden konnte. Die Reaktion wurde nach 15 Min. bei 70 °C inaktiviert.

Zum Produktvolumen wurden nun jeweils 80 µl Nuklease-freies Wasser hinzugefügt, um bei gleicher cDNA-Konzentration ein ausreichendes Probenvolumen für weiterführende Experimente zu erhalten. Die 0,2 ml-PCR-Gefäße wurden zur Aufbewahrung bei -20 °C eingefroren.

3.3.6 MeDIP

Die Messung und der Vergleich unterschiedlicher DNA-Methylierungsgrade von Promotorbereichen spezifischer Gene setzte die Trennung methylierter DNA-Fragmente vom Rest der genomischen DNA voraus. Dies wurde durch die *methylated DNA immunoprecipitation* (MeDIP) gewährleistet. Zur Durchführung diente das "Methylamp Methylated DNA Capture (MeDIP) Kit" samt Herstellerprotokoll, nach welchem mit geringen Änderungen vorgegangen wurde. Die Methode wurde zuerst von Weber et al. beschrieben (Weber et al. 2005). Ihr Prinzip besteht aus der Anreicherung methylierter DNA durch die Bindung eines Antikörpers an 5mC.

Ausgangsmaterial war aus Gewebe oder Vollblut extrahierte genomische DNA (s.o.). Zunächst musste sichergestellt werden, dass im weiteren Verlauf ausschließlich Probenmengen der gleichen Konzentration eingesetzt wurden, um letztendlich gemessene Mengenunterschiede tatsächlich auch auf unterschiedliche Methylierungsgrade zurückführen zu können. Daher wurden die DNA-Proben in einer Weise mit MC2-Puffer (*reaction buffer*) verdünnt und in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße überführt, dass in 108 µl Totalvolumen je 500 ng oder 1000 ng DNA (abhängig von der geringsten gemessenen Konzentration der jeweiligen Kohorte) gelöst waren.

Eine weitere Voraussetzung der Methode war die Zerlegung der DNA-Stränge in ähnlich große Fragmente von 500-1000 bp. Die Probengefäße wurden zu diesem Zweck in ein Eis-Wasserbad gegeben und von unten für 10 Min. bei einer Amplitude von 20 % der Geräteleistung mit Ultraschall einer Frequenz von 20 kHz beschossen (*sonication*). Durch den Schall wurden im Wasser Blasen erzeugt, die bei Aussetzen der akustischen Energie kollabierten und dabei Schockwellen freisetzten, welche die DNA-Stränge brechen ließen. Um die DNA-Fragmente den 5mC-Antikörpern zugänglich zu machen, mussten sie in Einzelsträngen vorliegen. Eine anschließende zweiminütige Denaturierung bei 95°C stellte dies sicher.

In der Zwischenzeit wurde eine Probenplatte (*well plate*) vorbereitet, in welcher später die Bindung der 5mC-Antikörper an die methylierten DNA-Fragmente stattfinden sollte. Dafür wurden in jede Vertiefung (*well*) der Platte je 100 µl MC1-Puffer (*antibody buffer*) und 1 µl 5mC-Antikörper gegeben und die *well plate* mit Parafilm M bedeckt. In der nun folgenden einstündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur auf der Schüttelplatte konnten die Antikörper an die beschichteten Böden der *wells* binden. Nach Ende der Inkubation wurden die *wells* von der Flüssigkeit befreit und jeweils einmal mit 150 µl der MC1- und MC3-Puffer (*wash buffer*) gewaschen. Nun wurden jeweils 100 µl der fragmentierten und denaturierten DNA-Proben in die *wells* gegeben und die *well plate* (von Parafilm M bedeckt) für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf die Schüttelplatte gestellt. Während dieser Zeit wurden diejenigen DNA-Fragmente von den an den Böden haftenden Antikörpern gebunden, die über 5mC verfügten (*pull-down*). Die unmethylierten Fragmente blieben im Puffer gelöst. Nach Ablauf der Inkubation wurden die *wells* dreimal mit 150 µl MC3-Puffer gewaschen, um alle nicht gebundenen

Fragmente zu entfernen. Jeweils 60 μl MC4-Puffer (*DNA release buffer*) und 1 μl Proteinase K wurden daraufhin in jedes *well* pipettiert und in einem Wasserbad bei 65 °C für eine Stunde inkubiert. Genauso wurde mit einem Input-1,5 ml Eppendorf-Gefäß mit 5 μl der fragmentierten DNA verfahren, das ohne *pull-down* bis zum Ende die genomische DNA beinhaltete und am Ende als Bezugsgröße diente. Nach erfolgter Inkubation wurde je Probe und Input eine Spin-Säule mit 100 μl MC5-Puffer (*binding buffer*) versehen. Zu Fällung der DNA wurden dann in jedes *well* und jedes Input-Gefäß 180 μl reines Ethanol gegeben, bevor der resuspendierte Inhalt dann auf die Spin-Säulen überführt wurde. Diese wurden anschließend bei 12000 U/Min. für 30 Sek. zentrifugiert. Die DNA konnte nun vom Silikagel der Spin-Säulen gebunden werden (siehe DNA-Isolation). Der Vorgang wurde zweimal mit jeweils 200 μl 90%igen Ethanols wiederholt. Zuletzt wurde ein Volumen von 20 μl MC6-Puffer (*elution buffer*) auf die Säule gegeben, diese bei 12000 U/Min. für 30 Sek. zentrifugiert und das Eluat in einem neuen 1,5 ml Eppendorf-Gefäß aufgefangen. Um ein ausreichendes Probenvolumen der aufgereinigten methylierten DNA zu erhalten, wurden noch 80 μl Nuklease-freies Wasser dazugegeben. Die Probengefäße konnten nun bei -20 °C zur Aufbewahrung eingefroren werden.

An die MeDIP schloss sich eine qRT-PCR zum Zweck der Amplifizierung von methylierten DNA-Sequenzen an, welche durch die Wahl der Primer definiert wurden. Im Vergleich zur genomischen Input-DNA konnten damit sequenzspezifisch Rückschlüsse auf den methylierten Anteil der ursprünglich eingesetzten DNA-Probe gemacht werden.

3.3.7 ELISA-basierte Quantifizierung globaler DNA-Methylierung

Um die Ergebnisse sequenzspezifischer qRT-PCR-Nachweise besser interpretieren zu können, wurde in einigen Fällen eine Messung des globalen DNA-Methylierungsgrades mithilfe des "MethylFlash Methylated DNA 5-mC Quantification Kit[s] (Colorimetric)" vorgenommen. Diese Methode basiert auf dem *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), welcher zuerst von zwei Arbeitsgruppen aus Schweden und den Niederlanden unabhängig voneinander beschrieben wurde (Engvall und Perlmann 1971; Van Weemen und Schuurs 1971). Die methylierte Fraktion der eingesetzten genomischen DNA wird durch Primärantikörper und Enzym-gekoppelte Zweitantikörper (auch "Detektionsantikörper") gebunden und nach einem Farbumschlag kolorimetrisch in einem Spektralphotometer quantifiziert.

Vorbereitend wurde der zehnfach konzentrierte Waschpuffer (ME1) mit destilliertem Wasser verdünnt, sodass er einfach konzentriert im weiteren Protokollverlauf verwendet werden konnte. Außerdem wurde die Positivkotrolle (ME4) mit einfach konzentriertem TE-Puffer auf eine Konzentration von 5 ng/µl verdünnt.

Ähnlich wie bei der MeDIP wurde für die globale Methylierungsquantifizierung eine Probenplatte (*well plate*) benutzt. In jedes *well* wurden zunächst 80 µl ME2-Lösung (*binding solution*) pipettiert. Dazu kamen jeweils 100 ng der aus EDTA-Blut gewonnenen DNA-Proben. Außerdem wurde je 1 µl der ME3-Negativkontrolle (unemtyhlierte Polynukleotide mit 50 % Cytosin) und der ME4-Positivkontrolle (methylierte Polynukleotide mit 50 % 5mC) für die spätere kolorimetrische Auswertung inkludiert. Proben und Kontrollen wurden nach Herstellerempfehlung in Duplikaten

pipettiert. Während der folgenden Inkubation von 90 Min. bei 37 °C konnten die DNA-Moleküle an den Boden der *well plate* binden. Nach Ablauf der Zeit wurden alle *wells* dreimal mit verdünntem ME1-Puffer gewaschen. Daraufhin wurden pro *well* 50 µl des 1:1000 mit ME1-Puffer verdünnten Primärantikörpers (ME5) in die *wells* gegeben, um diesen an die am Boden immobilisierte DNA zu binden. Dies geschah während der folgenden 90-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Eine dreimalige Waschung mit 150 µl ME1-Puffer entfernte dann die ungebundenen Antikörper aus den *wells*. 50 µl des Zweitantikörpers wurden anschließend in die *wells* mit 150 µl verdünntem ME1-Puffer gewaschen wurden. Um die Antikörper-Antikörper-Bindung zu stabilisieren, wurden zu den Proben jeweils 50 µl mit ME1-Puffer im Verhältnis 1:5000 verdünnte ME7-Lösung (*enhancer solution*) hinzugegeben und 30 Min. lang bei Raumtemperatur dort belassen. Eine letzte fünfmalige Waschung mit 150 µl ME1 entfernte ungebundene Bestandteile.

Da nun überall dort ein Enzym-gekoppelter Zweitantikörper an einen Primärantikörper gebunden war, wo 5mC-Moleküle auf dem Boden der *wells* hafteten, war zum quantitativen kolorimetrischen Nachweis der DNA-Menge nur noch das entsprechende Substrat nötig. Dieses wurde in Form von 100 µl der ME8-Lösung (*developer solution*) in jedes *well* gegeben und für zehn Min. unter Lichtausschluss der enzymatischen Reaktion ausgesetzt. Der Inhalt der *wells* hatte nun einen blauen Farbton angenommen, wobei bereits mit bloßem Auge die vorhandene 5mC-Menge abgeschätzt werden konnte – je intensiver das Blau, desto mehr 5mC. Die Reaktion wurde unter Zugabe der ME9-Lösung (*stop solution*) und leichtem Schütteln der *well plate* beendet – ein Farbumschlag ins Gelbe hatte stattgefunden. Die Quantifizierung geschah abschließend durch ein Mikoliterplatten-Lesegerät, welches spekralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm die Absorption er einzelnen Proben maß.

Die Quantifizierung des relativen Methylierungsstatus verschiedener Proben wurde mit folgender vom Kit-Hersteller bereitgestellte Formel durchgeführt:

$$5mC \% = \frac{(OD_{Probe} - OD_{ME3}) \div S}{(OD_{ME4} - OD_{ME3}) \cdot 2^* \div P} \cdot 100 \%$$

OD: optical density (durch das Lesegerät gemessene Absorption)

S: Menge der eingesetzten Proben-DNA

P: Menge der eingesetzten Positivkontrolle (ME4)

*: Der Faktor 2 berücksichtigt, dass die 5mC-Menge der Positivkontrolle ME4 nur 50 % beträgt.

Eine einfache Korrelation zwischen MeDIP- und ELISA-Ergebnissen wurde abschließend genutzt, um die (Un-)Abhängigkeit genspezifischer Hypermethylierung vom globalen Methylierungsstatus und damit ihre Aussagekraft zu klären.

3.3.8 qRT-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird zur sequenzspezifischen In-vitro-Amplifikation von DNA eingesetzt. Sie wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt und zählt heute zu den wichtigsten molekularbiologischen Methoden. Sie gewährleistet eine Vervielfältigung von DNA-Fragmenten, deren Ertrag durch die Menge der eingesetzten Komponenten determiniert ist. Zu diesen zählen die DNA-Vorlage (Template), zwei Primer, welche als Oligonukleotide die Startpunkte der Synthese markieren, eine temperaturresistente DNA-Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) als Bausteine der synthetisierten DNA sowie Mg²⁺-Ionen und eine Pufferlösung.

Die PCR besteht aus drei Schritten, die mit Temperaturwechseln verbunden sind und insgesamt 25-50 Mal durchlaufen werden. Im ersten Schritt, der Denaturierung, werden bei ca. 95°C die DNA-Doppelstränge voneinander gelöst, sodass die Bindungsstellen der Primer freigelegt werden. Das folgende *Annealing* besteht aus der Hybridisierung der Primer an die komplementären Template-Sequenzen. Die Reaktionstemperatur hängt dabei von der Länge und Basenabfolge der Primer ab, außerdem soll durch die Kühlung eine Renaturierung der DNA verhindert werden. Üblicherweise liegt die *Annealing*-Temperatur nur leicht unterhalb der Primer-Schmelztemperatur (T_m) und soll damit eine unspezifische Anlagerung verhindern. Im letzten Schritt, der Elongation, werden beim Temperaturoptimum der DNA-Polymerase die komplementären Stränge durch freie dNTPs aufgefüllt. Die Synthese beginnt am 3'-OH-Ende des Primers und folgt der DNA-Vorlage. Mg²⁺-Ionen stabilisieren dabei die Primer-Anlagerung. Da die während jeder Elongation synthetisierte DNA im nächsten Zyklus als Vorlage dient, nimmt die Amplikon-Menge exponentiell zu, bis die PCR-Substrate verbraucht sind.

Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) ist eine Sonderform der gewöhnlichen PCR, welche es ermöglicht, die wachsende DNA-Menge in Echtzeit zu messen. So kann die exponentielle Phase der Reaktion identifiziert und damit die Voraussetzung geschaffen werden, um die Amplikon-Menge verschiedener Proben quantifizieren und vergleichen zu können. Kernmerkmal der Methode ist der Einsatz eines DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffs. Das Fluoreszenzsignal nimmt proportional mit der Anzahl der amplifizierten DNA-Stränge zu. Detektiert wird das Signal von einer qRT-PCR-Maschine; im Rahmen dieser Arbeit wurde das Gerät "StepOne Plus" verwendet. Neben der Fluoreszenzdetektion übernimmt das Gerät auch die Steuerung der Temperaturwechsel. Der eingesetzte Farbstoff ist ein Interkalator namens SYBR Green I, der an die kleine Furche der doppelsträngigen DNA bindet. Das steigende Fluoreszenzsignal wird am Ende jeder Elongationsphase gemessen. Für die Messwerte sämtlicher Proben wird im exponentiellen Bereich der Amplifikation ein Grenzwert (*threshold*) definiert, der sich signifikant vom unspezifischen Hintergrundsignal (*baseline*) abhebt. Diejenige Zykluszahl, welche den Schwellenwert erreicht, wird als *threshold*-Zyklus (Ct) bezeichnet und ist umso kleiner, je mehr DNA detektiert wurde – sie ist also das vergleichbare Maß der Amplikon-Quantifizierung.

SYBR Green I markiert jegliche Doppelstrang-DNA, auch unspezifische Amplikons und Primer-Dimere. Zur Prüfung der Spezifität der eingesetzten Primer wurde deswegen eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. DNA-Doppelstränge dissoziieren abhängig von ihrer Sequenz bei einer bestimmten Schmelztemperatur. Dabei wird der gebundene Farbstoff wieder freigesetzt und eine Fluoreszenzabnahme ist messbar. Ein Maximum der Schmelzkurve zeigt an, dass besonders viele Fragmente derselben Schmelztemperatur und damit Sequenz vorliegen. Spezifische Primer amplifizieren nur ein DNA-Fragment und erzeugen in der Kurve nur ein Maximum; werden auch unspezifische Doppelstränge in größeren Mengen gebildet, erscheinen mehrere Peaks.

Als Reaktionsgefäße wurden die *wells* einer Mikroliterplatte verwendet, in die jeweils ein Gesamtvolumen von 20 µl pipettiert wurde. Dieses setzten sich, abhängig vom Primer-Hersteller, folgendermaßen zusammen:

Reagenz	Volumen
Fast SYBR Green Master Mix	10 µl
Vorwärts-Primer (20 µM)	0 ,2 μl
Rückwärts-Primer (20 µM)	0 ,2 μl
Nuklease-freies Wasser	4,6 µl
DNA	5 µl

Tabelle 4: Inhalt der qRT-PCR-wells mit Primern der Firma Microsynth.

Tabelle 5: Inhalt der qRT-PCR-wells mit Primern der Firma PrimerDesign.

Reagenz	Volumen
Fast SYBR Green Master Mix	10 µl
Primer-Mix (20 µM)	1 µl
Nuklease-freies Wasser	5 µl
DNA	5 µl

Der "SYBR Green PCR Master Mix" beinhaltet neben dem Fluoreszenzfarbstoff auch die thermostabile Taq-DNA-Polymerase, dNTPs und Pufferlösung. Alle Proben wurden in Triplikaten pipettiert. Die Steuerung des qRT-PCR-Geräts sowie die Auswertung der Ergebnisse wurden mit der "StepOne Software v2.3" durchgeführt.

Die eingesetzten Proben waren das Produkt entweder der MeDIP oder der RNA-Umschreibung. Die Auswertung erfolgte immer ausgehend vom C_t-Wert, unterschied sich im Rest aber je nach vorangegangener Methode. Bei der MeDIP diente der eingesetzte Input genomischer DNA als Bezug, auf dessen Basis der Methylierungsgrad der Probe ermittelt wurde:

$$5mC \% = \frac{2^{-\Delta C_t}}{20^*} \cdot 100 \%$$

ΔCt: Ct Probe - Ct Input

*: Der Faktor 20 berücksichtigt das geringere Input-DNA-Volumen von 5 µl im Vergleich zum Proben-DNA-Volumen von 100 µl.

Für die Auswertung der RNA-Umschreibung diente die mRNA-Expression des Housekeeping-Gens Gapdh als C_t-Bezugsgröße, weshalb in jeder cDNA-qRT-PCR auch Gapdh-Primer eingesetzt wurden. Die mRNA-Expression der Vergleichsgruppen wurde dann ins Verhältnis zur Kontrollgruppe gesetzt.

3.4 Histologische Methoden

3.4.1 Fixierung

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte histologische Methode basiert auf der Paraffin-Einbettung von Gewebe. Sie ist zwar aufwendiger als die Kryostat-Histologie, es werden dadurch Gewebestrukturen aber deutlich besser erhalten. Im ersten Schritt galt es, eine Autolyse der entnommenen Organe zu verhindern. Nach Sektion der Mäuse wurden sie daher in Biopsie-Kassetten überführt und über Nacht in wässriger vierprozentiger Formaldehyd-Lösung eingelegt. Dieses Fixativum gewährleistet eine Konservierung durch Quervernetzung der Proteine unter Ausbildung von Methylbrücken zwischen freien Aminogruppen.

3.4.2 Paraffin-Einbettung

Am nächsten Tag wurden die Biopsate für ca. vier Stunden unter fließendem Leitungswasser gewaschen und von überschüssigem Formaldehyd befreit. Nach folgendem Schema wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe dann entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet: 50 % (1,5 h), 70 % (1,5 h), 80 % (1,5 h), 95 % (2x 1,5 h), 100 % (2x 1,5h), Chloroform (2x 1,5 h), Paraffin (3x 1 h). Dieser Vorgang wurde vom automatisierten Gewebeinfiltrationsautomaten TP1020 übernommen. Nachfolgend wurden die Präparate in Paraffinblöcke gegossen und gekühlt, sodass dann mittels Mikrotom Gewebeschnitte von 3 µm Dicke angefertigt und auf Objektträger übertragen werden konnten. Nach einer Trocknung bei 37 °C über Nacht waren die Gewebeschnitte zur Färbung bereit.

3.4.3 Entparaffinierung und Rehydrierung

Jeder Färbung ging die Rehydrierung der Präparate voraus, um diese den Farbstoffen zugänglich zu machen. Dafür wurden die Gewebeschnitte zunächst zweimalig für zehn Minuten in 100% igem Xylol entparaffiniert und dann folgender absteigender Ethanolreihe zugeführt: 100 % (2x 10 Min.), 96 % (5 Min.), 80 % (5 Min.), 70 % (5 Min.), 50 % (5 Min.), 30 % (5 Min.), dest. Wasser (5 Min.).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Fixierung, Paraffin-Einbettung und Rehydrierung der histologischen Schnitte freundlicherweise von Frau Sarah Rinkleff durchgeführt.

3.4.4 MTS-Färbung

Die Masson-Trichrom-Färbung (MTS) diente im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich der Quantifizierung des Fibrosegrades der Mäuseherzen. Sie eignete sich dafür besonders gut, weil sich das blaue Kollagen kontrastreich von den rosaroten Kardiomyozyten abhob.

Nach abgeschlossener Rehydrierung wurden die Schnitte für 15 Min. in 56 °C-warmer Bouin-Lösung nochmals fixiert. Unter fließendem Leitungswasser wurden die Präparate dann gespült, bevor sie für 5 Min. zur Zellkernfärbung in Weigert's Eisenhämatoxylin-Lösung getaucht wurden. Der Farbumschlag fand während des folgenden Spülens unter fließendem Leitungswasser statt, woraufhin dreimalig in destilliertem Wasser gewaschen wurde. Die rote Zytoplasmafärbung erfolgte mittels fünfminütiger Behandlung in Biebrich-Scharlachrot-Säurefuchsin-Lösung. Nach abermaliger dreimaliger Waschung in destilliertem Wasser wurden die Präparate in Vorbereitung der darauffolgenden Färbung mit Anilinblau für 5 Min. in eine Phosphomolybdän-/ Phosphowolframsäure-Lösung getaucht. Die anschließende 10-minütige Einwirkzeit in Anilinblau bewirkte die Anfärbung der Kollagenfasern. Eine Ausdifferenzierung der Färbung erfolgte durch das jeweils dreifache Eintauchen in 1%ige Essigsäure und destilliertes Wasser. Die Konservierung der gefärbten Schnitte erforderte eine erneute Entwässerung, die durch das jeweils dreimalige Eintauchen in 96%iges und dann in 100%iges Ethanol erfolgte. Zum Schluss wurden die Schnitte abermals mit Xylol (2x 5 Min.) behandelt und mit Entellan eingedeckt.

3.4.5 PAS-Färbung

In der Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion, syn. PAS-Färbung) werden kohlenhydratreiche (extra-)zelluläre Bestandteile wie Glykoproteine, Glykogen oder Muzine in einem magenta-roten Ton angefärbt. Sie basiert auf der Oxidation von Hydroxylgruppen zu Aldehydgruppen, wobei die Perjodsäure als Oxidationsmittel fungiert. Eine Komplexbildung mit dem im Schiffschen Reagenz enthaltenen schwefelsauren Fuchsin verursacht dann die Rotfärbung.

Nach der Bewässerung wurden die Präparate für 10 Min. in 1%iger Perjodsäure angesäuert. Nachfolgend wurden sie zuerst für 10 Min. unter fließendem Leitungswasser und dann kurz in destilliertem Wasser gespült. Der Farbumschlag fand nach zehnminütiger Einwirkzeit im Schiffschen Reagenz statt; wieder wurde unter fließendem Leitungswasser für 5 Min. gespült. Um auch die Kerne im Präparat anzufärben, wurden die Schnitte für eine Dauer von 5 Min. in die saure Hämalaunlösung nach Mayer getaucht und für 10 Min. unter fließendem Leitungswasser durch die pH-Wert-Erhöhung "gebläut". Am Ende wurden die Präparate ebenfalls dehydriert (1 Min. 96 % EtOH, 2x 2 Min. 100 % EtOH), in Xylol (2x 5 Min.) geklärt und mit Entellan eingedeckt.

3.4.6 Immunfluoreszenzfärbung

Diese Färbung ist für die Darstellung und Lokalisation spezifischer Proteine im Gewebeschnitt geeignet. Die beschriebene Methode basiert auf dem Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz (IF). Dabei werden die Zielstrukturen durch Primärantikörper gebunden. Fluorochrom-markierte Sekundärantikörper binden an die Primärantikörper, sodass die Proteine unter einem Fluoreszenzmikroskop aufleuchten und sich vom schwarzen Hintergrund abheben.

Im Protokoll schloss sich dem letzten Schritt der Rehydrierung das zweimalige Waschen der Präparate in PBS an. Um den Primärantikörpern die Epitope der Proteine zugänglich zu machen – diese also zu demaskieren – wurden die Gewebeschnitte mithilfe eines Dampfgarers bei 95 °C für 40 Min. in Citratpuffer (pH 6) behandelt. Nachdem die Präparate abgekühlt waren, wurden sie erneut zweimalig für 5 Min. in PBS gewaschen. Anschließend mussten unspezifische Antikörper-Bindungstellen abgesättigt werden. Deshalb wurden die Präparate für 30 Min. bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer in 1% igem BSA (gelöst in PBS) geblockt. Schließlich wurde der in der BSA-Lösung verdünnte Primärantikörper auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Präparate dreimalig für 5 Min. mit PBS gewaschen und anschließend mit dem in BSA-Lösung verdünnten Sekundärantikörper (1:200) behandelt. Nach einer Inkubation von 45 Min. wurde erneut dreimal 5 Min. mit PBS gewaschen. Die Gewebeschnitte wurden dann für 5 Min. dem blauen DNA-Fluorochrom 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, 1 µg/ml) ausgesetzt, um die Zellkerne anzufärben. Ein letztes Mal wurden die Schnitte für 5 Min. in PBS gewaschen. Dann wurden sie mit Immu-Mount eingedeckt und durch klaren Nagellack versiegelt.

3.4.7 Immunhistochemische Färbung

Auch die Immunhistochemie (IHC) basiert auf dem indirekten Nachweis spezifischer Protein-Epitope mittels primärer und sekundärer Antikörper. Die hier eingesetzte ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex) bedient sich der hohen Bindungsaffinität des in Hühnereiweiß vorhandenen Glykoproteins Avidin zum Vitamin Biotin. Ein biotinylierter Sekundärantikörper bindet an einen unkonjugierten proteinspezifischen Primärantikörper. Durch Zugabe von Peroxidase-gekoppeltem Avidin in Form einer ABC-Lösung entstehen AB-Komplexe. Schließlich wird das Substrat 2,3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) hinzugefügt, welches nach Umsetzung durch die Peroxidase als Chromogen wirkt und unter einem Lichtmikroskop detektiert werden kann. Diese Methode gewährleistet eine hohe Sensitivität, da zum einen (wie auch bei der Immunfluoreszenz) die Sekundärantikörper an mehrere Epitope der Primärarantikörper binden können und zum anderen jedes Avidin-Molekül im AB-Komplex vier Biotin-Bindestellen besitzt. Beide Mechanismen tragen zur lokalen Signalverstärkung der Farbintensität bei. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für diese Methode das "Vectastain Universal Elite ABC Kit" verwendet.

Genau wie bei der Immunfluoreszenz wurden die Präparate nach abgeschlossener Entparaffinierung und Rehydrierung in PBS gewaschen, mit Citratpuffer behandelt und dann abermals gewaschen. Und auch hier sollten unspezifische Reaktionen verhindert werden: Zu diesem Zweck wurden die Präparate zweimal geblockt – das erste Mal für 30 Min. in 0,3%igem Peroxidase-Block zur Verhinderung einer Substrat-Umsetzung durch endogene Peroxidasen, das zweite Mal für 20 Min. in im Kit enthaltenen *Horse Normal Serum*, von welchem zuvor zwei Tropfen in 5 ml PBS gelöst worden waren. Dies sollte unspezifische Antikörperbindungen unterbinden. Dazwischen wurde dreimal fünfminütig in PBS gewaschen. Schließlich wurde der in verdünntem *Horse Normal Serum* gelöste Primärantikörper auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Alle vollzogenen wie auch nachfolgenden Inkubationen fanden zum Schutz vor Verdunstung in Feuchtkammern statt. Am nächsten Tag wurden die Präparate gewaschen (3x 5 Min. in PBS) und für eine Dauer von 30 Min. mit dem sekundären "Vectastain Biotinylated Universal Antibody" (2 Tropfen in 5 ml PBS) behandelt. Anschließend wurde die ABC-Lösung (je zwei Tropfen der Reagenzien A und B in 5 ml PBS) auf die Schnitte pipettiert und für 30 Min. inkubiert. Wieder wurde dreimal mit PBS gewaschen, bevor das AEC-Substrat auf die Präparate gegeben wurde. Die Farbreaktion wurde mithilfe eines Lichtmikroskops kontrolliert und durch dreimaliges Waschen in PBS beendet. Um die Zellkerne blau zu färben, wurden die Gewebeschnitte dann für 6 Min. in saurer Hämalaunlösung nach Mayer inkubiert und anschließend 5 Min. lang unter fließendem Leitungswasser gebläut. Zuletzt wurden die Präparate mit Immu-Mount und Nagellack eingedeckt.

3.4.8 Auswertung der Histologie

Die Quantifizierung des Herzfibrosegrades erfolgte anhand der MTS-gefärbten Gewebeschnitte. Es wurde sich dabei die Blaufärbung von Kollagenfasern zunutze gemacht. Interstitiell blau gefärbte Areale wurden als "positiv fibrotisch" definiert, perivaskuläre und artifizielle Blaufärbungen, Periund Endokard sowie alle Rottöne als "negativ fibrotisch". Bei 400-facher Vergrößerung des Lichtmikroskops "BX43" wurden durch Verwendung der Software "cellSens Dimension 1.6" pro Schnitt zufällig zehn Gesichtsfelder im Myokardgewebe fotografiert und am Bildschirm unter einem Folienraster (638 x 1 cm²) betrachtet. Es wurden dann die total positiven Quadrate gezählt – partiell positive Quadrate wurden zur Summe 1 aufaddiert. Der anteilige Fibrosegrad pro Präparat ergab sich aus dem über alle zehn Gesichtsfelder gemittelten Verhältnis positiver Quadrate zur Gesamtzahl aller Quadrate.

Mit der PAS-Färbung können die Zellgrenzen von Kardiomyozyten optimal dargestellt werden. Daher diente sie zur Bestimmung des durchschnittlichen Kardiomyozytendurchmessers, der im Rahmen dieser Arbeit als Marker für Herzhypertrophie fungierte. Bei 400-facher Vergrößerung des beschriebenen Mikroskops konnte mit selbiger Software die Zellbreite im Längsschnitt 100 Mal pro Präparat gemessen und ihr Durchschnitt ermittelt werden.

Die durchgeführten IHC-Färbungen dienten im Falle von Rasal1 und Tet3 zur Quantifizierung der Proteinexpression. Bei der Betrachtung von zehn Gesichtsfeldern pro Gewebeschnitt bei 400-facher Vergrößerung durch die Okulare des "BX43" hindurch wurden alle rot gefärbten (also das entsprechende Protein beherbergenden) interstitiellen Zellen gezählt. Es wurde darauf geachtet, dass die Gesamtzellzahl pro Gesichtsfeld nicht wesentlich differierte. Der Vergleich der gemittelten Positivzell-Zahlen repräsentierte die relative Proteinexpression. Da Serca2 in Kardiomyozyten weit verbreitet ist, erzeugt die IHC-Färbung ein flächiges Erscheinungsbild unterschiedlicher Farbintensitäten. Deshalb konnte hier keine exakte Quantifizierung der Proteinexpression vorgenommen, sondern anhand der Intensitätsunterschiede lediglich ein Trend abgeschätzt werden.

Die Kollagen-IF-Färbung schließlich wurde am "Axiovert S100 TV"-Mikroskop mit der "XM10"-Fluoreszenzkamera bei 400-facher Vergrößerung analysiert. Dafür wurden am Computer mit der Software "cell^D" zehn Gesichtsfelder pro Präparat fotografiert. Auch hier wurde unter Verwendung der Rasterfolie der Positiv-Anteil (grün gefärbt im Gegensatz zu schwarz, ungefärbt) an der Gesamtfläche ermittelt und der Mittelwert inner- und außerhalb der jeweiligen Kohorte verglichen.

3.5 Statistische Analysen

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Mittelwert mit Standardabweichung und Signifikanzniveau. Letzteres wurde beim Vergleich und der Korrelation zweier Parameter mithilfe des studentischen T-Tests und multiplen Vergleichen durch Varianzanalyse (ANOVA) und Bonferroni-Korrektur ermittelt. Statistisch signifikant war dabei ein p-Wert kleiner als 0,05. Alle Graphen und Balken-Diagramme wurden mithilfe der Software "GraphPad Prism 6" erstellt. Dies erfolgte durch Herrn Dr. Björn Tampe (Klinik für Nephrologie und Rheumatologie, Universitätsmedizin Göttingen). Folgende Kennzeichnung diente dabei der Übersichtlichkeit in Bezug auf signifikante p-Werte: * für p<0,05, ** für p<0,01, *** für p<0,001, **** für p<0,001.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung des Mausmodells

4.1.1 Anpassung der AT-II-Applikationsdauer

Im Rahmen dieser Arbeit wurde kardiale Fibrose im Mausmodell durch das Hormon AT-II induziert. Zu Beginn wurde der Effekt einer AT-II-Applikationsdauer von zwei und vier Wochen verglichen. Die histologische Auswertung nach zweiwöchiger Applikation ließ keine signifikanten Veränderungen des kardialen Fibrosegrades erkennen (**Abbildung 9A, C**). Auch eine kardiale Hypertrophie konnte nicht festgestellt werden, hier zeigten sich im Kontrollvergleich sogar geringere Kardiomyozytendurchmesser (**Abbildung 9B**). Der relative Kollagen-1-Anteil erwies sich ebenfalls als indifferent zur Kontrollgruppe (**Abbildung 9D**).

Erst die histologische Auswertung der 4-Wochen-Kohorte zeigte eine signifikante Fibrosierung, die mit allen drei Parametern messbar war (**Abbildung 9A-D**).



Abbildung 9: AT-II-Applikation im 2- und 4-Wochen-Vergleich. (A) Repräsentative Färbungen für PAS (Messbalken 50 μ m), MTS (Messbalken 50 μ m) und Kollagen-1 (Messbalken 25 μ m). (B) Durchschnittlicher Kardiomyozytendurchmesser. (C-D) Prozentuale linksventrikuläre interstitielle Fläche positiv für Fibrose und Kollagen-1. (Die Graphen zeigen Mittelwerte ± Standardabweichung; ** p<0,01, **** p<0,0001, # keine Signifikanz.)

4.2 Repression von Rasal1 und Serca2 unter AT-II-Einfluss

4.2.1 Lokalisation und Expression von Rasal1

Aus der IHC-Färbung war ersichtlich, dass das Ras-Inhibitor-Protein Rasal1 im Herzen vor allem interstitiell exprimiert wird. Es ließ sich in positiv angefärbten und gut von Kardiomyozyten abgrenzbaren interstitiellen Zellen lokalisieren (**Abbildung 10A**). Die Kontrolltiere der 2- und 4-Wochen-Kohorten wiesen eine hohe relative Expression des Proteins auf. Unter AT-II-Einfluss wurde Rasal1 in beiden Gruppen nach AT-II-Applikation über zwei bzw. vier Wochen weniger stark exprimiert (**Abbildung 10B**).



Abbildung 10: Rasal1-Expression nach AT-II-Applikation. (A) Repräsentative IHC-Färbung für Rasal1 (Messbalken 50 μ m). (B) Durchschnittliche Zahl der Rasal1-postiven interstitiellen Zellen pro Gesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung als Marker der relativen Rasal1-Expression auf Protein-Niveau. (Die Graphen zeigen Mittelwerte ± Standardabweichung; **** p<0,0001, # keine Signifikanz.)

4.2.2 Lokalisation und Expression von Serca2

Im Falle von Serca2 wurde zunächst eine IHC-Übersichtsfärbung mit einem Antikörper angefertigt, der Isoform-unspezifisch war; das Protein ließ sich im Zytoplasma der Kardiomyozyten lokalisieren (**Abbildung 11**). Weder nach zwei- noch vierwöchiger AT-II-Applikation ließ sich ein deutlicher Verlust von Serca2 nachweisen. Auffällig in der Histologie aller Kohorten war eine Inhomogenität zwischen Kardiomyozyten desselben Gewebeschnitts. Auch die Western Blot-Analyse mit Antikörpern gegen Serca2 zeigte eine indifferente Proteinexpression gegenüber der Kontrollgruppe (**Abbildung 12B, C**).



Abbildung 11: Serca2-Expression nach AT-II-Expression. (A) Repräsentative IHC-Färbung für Serca2 (Messbalken 50 µm).

Atp2a2 codiert für mehrere Isoformen des Serca2-Proteins. Somit wurde die Expression der Isoformen Serca2a und Serca2b analysiert. Die qRT-PCR zeigte, dass Serca2a auf mRNA-Ebene absolut betrachtet deutlich stärker exprimiert wird als Serca2b (**Abbildung 12D**). Mittels Western Blot wurde der Effekt von AT-II auf die Expression beider Proteine gemessen. Das Hormon hatte keinen signifikanten Effekt auf die Serca2a-Expression; die Expression von Serca2b ging hingegen deutlich zurück (**Abbildung 12B, D, E, F**). Dieser Rückgang konnte auch histologisch dargestellt werden (**Abbildung 12G**).



Abbildung 12: Expression von Serca2, Serca2a und Serca2b nach AT-II-Applikation. (A) Die mRNA-Expression von Serca2a und Serca2b wurde mittels qRT-PCR analysiert. (Analyse in technischen Replikaten relativ zu Gapdh; die Graphen zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung; ** p<0,01.) (B-D, E, F) Western Blots mit Antikörpern gegen Serca2, Serca2a und Serca2b. Die relative Bandenintensität wurde relativ zu Gapdh normalisiert. (Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung; ** p<0,01, (B-D, E, F) Western Blots mit Antikörpern gegen Serca2, Serca2a und Serca2b. Die relative Bandenintensität wurde relativ zu Gapdh normalisiert. (Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung; ** p<0,01, # keine Signifikanz.) (G) Repräsentative IHC-Färbung für Serca2 und Serca2b (Messbalken 50 µm).

4.2.3 DNA-Promotormethylierung von Rasal1 und Atp2a2

Aberrante Promotormethylierung kann zur Suppression der assoziierten Gene und ihrer Produkte führen. Ob der unter AT-II-Applikation beobachtete Rückgang der Rasal1- und Serca2b-Expression ebenso erklärbar ist, wurde mittels MeDIP untersucht. Tatsächlich wurde nach vier Wochen sowohl bei *Rasal1* als auch bei *Atp2a2* im Kontrollvergleich eine Hypermethylierung der Promotorregionen in genomischer DNA aus Herzgewebe gefunden, deren Mittelwerte im Kontrollvergleich aufgrund hoher Varianzen jedoch bei der hier betrachteten Kohortengröße keine Signifikanz aufweist (**Abbildung 13**).



Abbildung 13: Promotormethylierung von Rasal1 und Atp2a2 im Gewebe. (A, B) Zur Input-Kontrolle relativer Methylierungsgrad der DNA-Promotorregionen von Rasal1 und Atp2a2 nach zweiund vierwöchiger AT-II-Applikation. (Die Graphen zeigen Mittelwerte ± Standardabweichung; # keine Signifikanz.)

4.3 Der therapeutische Effekt von Hydralazin im epigenetischen Kontext

4.3.1 Demethylierung von Rasal1 und Atp2a2 durch Hydralazin

Einer weiteren Versuchstier-Kohorte wurde über einen Zeitraum von vier Wochen neben AT-II auch Hydralazin verabreicht. Der Methylierungsgrad der *Rasal1-* und *Atp2a2-*Promotorregionen wurde im Vergleich zur alleinigen AT-II-Gabe analysiert. In beiden Fällen war ein Rückgang auf Methylierungslevel ähnlich denen der PBS-behandelten Tiere nach Hydralazin-Applikation messbar (**Abbildung 14**).



Abbildung 14: Normalisierung der Promotormethylierung unter Hydralazin. Zur Input-Kontrolle relativer Methylierungsgrad der DNA-Promotorregionen von (A) Rasal1 und (B) Atp2a2 nach vierwöchiger AT-II-Applikation ohne und mit paralleler Hydralazin-Gabe. (Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung; ** p<0,01.)

4.3.2 Restaurierung der Proteinexpression unter Hydralazin

Mittels IHC-Färbung wurde wie bereits zuvor die Quantität der Rasal1-positiven Zellen bestimmt und das Ergebnis mit denen der Kontroll- sowie AT-II-Kohorten verglichen. Die Proteinexpression von Serca2b wurde mittels Western Blot gemessen. In beiden Fällen stiegen die Werte im Vergleich zur AT-II-Kohorte wieder an und näherten sich derjenigen der Kontrollgruppe an (**Abbildung 15A**, **B**, **F-H**), wobei die bloße Zählung Rasal1-positiver Zellen keine signifikante Zunahme erkennen ließ. Die Expression von Serca2 insgesamt und der Isoform Serca2a zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Kontroll- oder AT-II-Gruppe (**Abbildung 15C, D**).



Abbildung 15: Proteinexpression nach Hydralazin-Therapie. (A) Repräsentative IHC-Färbung für Rasal1 (Messbalken 50 μ m) und Serca2 (Messbalken 50 μ m). (B) Durchschnittliche Zahl der Rasal1postiven interstitiellen Zellen pro Gesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung als Marker der relativen Rasal1-Expression auf Protein-Niveau. (C-G) Western Blots mit Antikörpern gegen Serca2, Serca2a und Serca2b. Die relative Bandenintensität wurde zu Gapdh normalisiert. (G) Die Restauration von Serca2b wurde mittels IHC-Färbung bestätigt. (Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung; * p<0,05, # keine Signifikanz.)

4.3.3 Die Wirkung von Hydralazin auf Herzfibrose

Im Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Effekt von Hydralazin auf Herzfibrose wurde bei den Mäusen auch dieser Kohorte der Fibrosegrad bestimmt, das Hypertrophie-Ausmaß ermittelt und der Fibrose-Marker Kollagen-1 quantifiziert. Alle drei Parameter bestätigten den therapeutischen Nutzen von Hydralazin: Die Messwerte lagen in jedem Fall zwischen denen der PBS- und AT-II- Kohorte und belegten damit eine Besserung der kardialen Erkrankung unter Hydralazin (**Abbildung 16**).



Abbildung 16: Rückgang der Herzfibrose unter Hydralazin. (A) Repräsentative Färbungen für PAS (Messbalken 50 μ m), MTS (Messbalken 50 μ m) und Kollagen-1 (Messbalken 25 μ m). (B) Durchschnittlicher Kardiomyozytendurchmesser. (C, D) Prozentuale linksventrikuläre interstitielle Fläche positiv für Fibrose und Kollagen-1. (Die Graphen zeigen Mittelwerte ± Standardabweichung; * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.)

4.4 Etablierung eines Biomarkers

4.4.1 "Liquid Biopsy" – DNA-Promotormethylierung im Blut

Bisher beschränkte sich das Methylierungsscreening auf DNA, die aus kardialem Gewebe isoliert worden war. Unter Anwendung des "*Liquid Biopsy*"-Prinzips wurde DNA statt aus Gewebe nun aus Vollblut isoliert. Analog zur transkriptionellen Suppression von Rasal1 und Serca2 zeigte sich auch im Blut eine vermehrte Promotormethylierung von *Rasal1* und *Atp2a2*, die sich trotz abermals hoher Varianzen hier als signifikant darstellte (**Abbildung 17A, B**).



Abbildung 17: Promotormethylierung von *Rasal1* und *Atp2a2* im Blut. Zur Input-Kontrolle relativer Methylierungsgrad der DNA-Promotorregionen von (A) *Rasal1* und (B) *Atp2a2* nach zwei- und vierwöchiger AT-II-Applikation. (Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung; * p<0,05, ** p<0,01, # keine Signifikanz.)

4.4.2 Korrelation intrasanguinaler Promotormethylierung mit Fibrose-Indikatoren

Bei beiden untersuchten Genen zeigte die über vier Wochen mit AT-II behandelte Gruppe also höhere Methylierungswerte als die jeweilige Kontrollgruppe. Um die Aussagekraft des potentiellen Biomarkers "Promotormethylierung" für Herzfibrose zu testen, wurden die einzelnen Methylierungswerte zu den zuvor erhobenen Indikatoren für Fibrose (Abbildung 9) in Beziehung gesetzt. Dabei wurden die MeDIP-Ergebnisse aus Gewebe- sowie Vollblut-DNA der 2- und 4-Wochen-Kohorte zu fibrotischer Fläche, Kollagen-1-positiver Fläche und durchschnittlichem Kardiomyozytendurchmesser korreliert - der Biomarker wurde also interindividuell getestet, auch um der großen Streuung Rechnung zu tragen. Für Rasal1 zeigte sich ein eindeutiger Zusammenhang - so erwies sich die Korrelation zwischen der Rasal1-Methylierung aus Gewebe-DNA einerseits und der linksventrikulären fibrotischen Fläche, der Kollagen-1-positiven Fläche sowie dem durchschnittlichen Kardiomyozytendurchmesser andererseits als signifikant. Auch die in Blut-DNA gemessene Rasal1-Methylierung korrelierte mit der Kollagen-1-positiven Fläche sowie dem durchschnittlichen Kardiomyozytendurchmesser, jedoch nicht in signifikantem Ausmaß mit der fibrotischen Fläche (Abbildung 18). Die entsprechende Atp2a2-Messung zeigte nur für DNA aus Gewebe einen signifikanten korrelativen Zusammenhang zwischen Promotormethylierung und linksventrikulärer fibrotischer Fläche, der Kollagen-1-positiven Fläche sowie dem durchschnittlichen Kardiomyozytendurchmesser, für DNA aus Blut waren diese Zusammenhänge nicht erkennbar (Abbildung 19).



Abbildung 18: Korrelationen muriner Promotormethylierung von *Rasal1* und Fibrose-/ Hypertrophie-Markern. (A, B) Korrelation von Promotormethylierung aus Gewebe-/Vollblut-DNA zu fibrotischer Fläche des linken Ventrikels. (C, D) Korrelation von Promotormethylierung aus Gewebe-/Vollblut-DNA zu Kollagen-1-positiver Fläche des linken Ventrikels. (E, F) Korrelation von Promotormethylierung aus Gewebe-/Vollblut-DNA zu durchschnittlichem Kardiomyozytendurchmesser. (n biologische Replikate; die Graphen zeigen lineare Regressionsanalysen samt r²- und p-Werten.)



Abbildung 19: Korrelationen muriner Promotormethylierung von *Atp2a2* und Fibrose-/ Hypertrophie-Markern. (A, B) Korrelation von Promotormethylierung aus Gewebe-/Vollblut-DNA zu fibrotischer Fläche des linken Ventrikels. (C, D) Korrelation von Promotormethylierung aus Gewebe-/Vollblut-DNA zu Kollagen-1-positiver Fläche des linken Ventrikels. (E, F) Korrelation von Promotormethylierung aus Gewebe-/Vollblut-DNA zu durchschnittlichem Kardiomyozytendurchmesser. (n biologische Replikate; die Graphen zeigen lineare Regressionsanalysen samt r²- und p-Werten.)

4.4.3 Normalisierung aberranter Promotormethylierung durch Hydralazin ist im Blut detektierbar

Um aufzuzeigen, ob die effektive Normalisierung aberranter Promotormethylierung auch im Blut detektierbar ist, erfolgte die Messung von *Rasal1-/Atp2a2*-Promotormethylierung mittels MeDIP auch aus Vollblutproben (**Abbildung 20**). Hierbei zeigte sich eine Normalisierung der Promotormethylierung beider Gene unter Hydralazin-Therapie, die im Falle von *Rasal1* signifikant war. Damit bestätigten sich die Ergebnisse aus der Gewebe-DNA und auch das "*Liquid Biopsy"-*Prinzip konnte erneut erfolgreich angewandt werden.



Abbildung 20: Normalisierung der intrasanguinalen Promotormethylierung unter Hydralazin-Therapie. Intrasanguinale Promotormethylierung von (A) *Rasal1* und (B) *Atp2a2* unter AT-II- und Hydralazin-Einfluss. (Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung; * p<0,05, # keine Signifikanz.)

Einige der an der Demethylierung wesentlich beteiligten Enzyme entstammen der Tet-Proteinfamilie. Aufbauend auf Vorarbeiten, die in der Niere eine spezifische Induktion von Tet3 durch Hydralazin gezeigt hatten (Tampe et al. 2017), wurde mittels IHC-Färbung die Expression von Tet3 bestimmt (**Abbildung 21**). Es zeigte sich ein Rückgang der Tet3-Expression nach AT-II-Applikation; dagegen war die Hydralazin-Therapie mit einer Restauration von Tet3 assoziiert.



Abbildung 21: Tet3-Expression nach AT-II- und Hydralazin-Applikation. (A) Repräsentative Färbungen für Tet3 (Messbalken 50 μ m). (B) Durchschnittliche Zahl der Tet3-postiven interstitiellen Zellen pro Gesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung als Marker der relativen Rasal1-Expression auf Protein-Niveau. (Die Graphen zeigen Mittelwerte ± Standardabweichung; *** p<0,001.)

4.5 Etablierung des Biomarkers im Humanmodell

4.5.1 Korrelation intrasanguinaler Promotormethylierung mit Fibrosegrad

Von der Universität Mannheim wurden im Rahmen dieser Arbeit EDTA-Vollblutproben von 38 HOCM-Patienten sowie die anhand von MRT-Daten errechneten korrespondierenden Fibrosegrade (gemessen an einer verzögerten Anreicherung in T2-Wichtung) zur Verfügung gestellt. Mittels MeDIP wurden auch hier die Promotormethylierungslevel von *RASAL1* und *ATP2A2* bestimmt. Im Ergebnis korrelierte die Promotormethylierung gemessen im Blut der Patienten mit dem Fibrosegrad (**Abbildung 22A, B**), allerdings erreichte nur *ATP2A2* statistische Signifikanz auf niedrigem Niveau. Dagegen zeigte sich kein korrelativer Zusammenhang zwischen den Promotormethylierungsleveln von *RASAL1* und *ATP2A2* und der linksventrikulären



Abbildung 22: Promotormethylierung im Humanmodell. (A, B) Korrelation zwischen Promotormethylierung von RASAL1/ATP2A2 und Fibrosegrad (n biologische Replikate, die Graphen zeigen lineare Regressionsanalysen samt r²- und p-Werten). (C, D) Korrelation zwischen Promotormethylierung von RASAL1/ATP2A2 und Ejektionsfraktion (n biologische Replikate, die Graphen zeigen lineare Regressionsanalysen samt r²- und p-Werten). Die Daten zum Fibrosegrad (verzögerte Anreicherung in T2) wurden von der Klinik für Kardiologie der Universitätsmedizin Mannheim zur Verfügung gestellt.

4.5.2 Eingrenzung des Patientenkollektivs

Bei der Korrelation der Promotormethylierung mit dem Fibrosegrad fiel auf, dass besonders bei Patienten mit pathologischer Ejektionsfraktion dieser Zusammenhang nicht zu bestehen schien. Also wurden für eine weitere Berechnung der Korrelation nur Patienten mit einer physiologischen Pumpfunktion (EF>55 %) inkludiert. Tatsächlich ergab sich nach dieser Vorauswahl ein hochsignifikanter Zusammenhang für RASAL1 und ATP2A2 (Abbildung 23).



Abbildung 23: Promotormethylierung bei HOCM-Patienten mit physiologischer EF. Korrelation zwischen Promotormethylierung von (A) RASAL1/ (B) ATP2A2 und Fibrosegrad (n biologische Replikate, die Graphen zeigen lineare Regressionsanalysen samt r²- und p-Werten). Die Daten zum Fibrosegrad (verzögerte Anreicherung in T2) wurden von der Klinik für Kardiologie der Universitätsmedizin Mannheim zur Verfügung gestellt.

5 Diskussion

5.1 Fibroseinduktion durch AT-II im 2- und 4-Wochen-Vergleich

Voraussetzung für die Forschung im Tiermodell zum Thema dieser Arbeit war eine etablierte Methode zur konsistenten Induktion kardialer Fibrose. Eine zuvor in der Arbeitsgruppe Zeisberg eingesetzte Praktik ist die *ascending aortic constriction* (AAC), eine künstliche Aortenstenose mit resultierender Druckbelastung des Herzens. Sie wird in Mäusen und Ratten häufig zur Herbeiführung von kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz verwendet (Schunkert et al. 1990; Weinberg et al. 1994). Vorteilhaft bei dieser Methode sind die isoliert kardiale Betroffenheit ohne systemische Blutdruckerhöhung sowie der hohe potentiell erreichbare Fibrosierungsgrad. Dieser äußerst invasive Eingriff ist jedoch sehr anspruchsvoll, wird häufig von Komplikationen begleitet und geht mit einer hohen Mortalität einher. Ähnliches gilt für die *transverse aortic constriction* (TAC). Eine Alternative der Fibroseinduktion ist die Gabe des Hormons AT-II. Sie ist komplikationsärmer und kam hier daher zur Anwendung.

Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass AT-II großen systemischen und organspezifischen Einfluss auf die Entstehung kardialer Fibrose hat. Patienten mit Fibrose-assoziierten kardiovaskulären Erkrankungen wie arteriellem Hypertonus, Herzhypertrophie oder -insuffizienz weisen erhöhte Plasma-Level dieses Moleküls auf (Kim und Iwao 2000; Brasier et al. 2002; Crowley et al. 2006). Dabei kommt es sowohl systolisch als auch diastolisch zu Funktionseinschränkungen (Clarkson et al. 1994). Hauptsächlich als Ursache von Herzhypertrophie und einhergehender Fibrose verantwortlich ist dabei der AT1-Rezeptor, dessen Wirkung sich dabei sowohl im Myokard selbst als auch in den peripheren Blutgefäßen entfaltet, deren Konstriktion zu kardialer Nachlasterhöhung führt (Sadoshima und Izumo 1993; Harada et al. 1998). Eine Rezeptorblockade hat antifibrotische Effekte, sodass AT1-Rezeptorantagonisten bei fibrotischen Herzerkrankungen therapeutische Wirkung zeigen (Regan et al. 1997; Schmieder et al. 2007). Mittlerweile ist bekannt, dass auch der AT2-Rezeptor eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie spielt (Ichihara et al. 2001). AT-II hat außerdem einen stimulierenden Effekt auf die Transkription von TGF-\beta1, welcher seinerseits profibrotisch wirkt (Campbell und Katwa 1997; Schultz et al. 2002; Gao et al. 2009). Diese Erkenntnisse führten zur Entwicklung des AT-II-Tiermodells zur Forschung an chronischen Herzerkrankungen, welches in vorangehenden Arbeiten schon Anwendung fand (Matsui et al. 2004; Schellings et al. 2010). Exogener AT-II-Einsatz führt jedoch nicht nur zu einer eingeschränkten Pumpfunktion; auch diastolische Funktionseinschränkungen können direkt durch AT-II hervorgerufen werden, wie die Etablierung eines HFpEF-Mausmodells zeigt (Regan et al. 2015).

Es muss betont werden, dass AT-II nicht nur auf das Herz profibrotisch wirkt. Auch in der Niere kann das Hormon zur Restrukturierung des Parenchyms führen, indem es unter anderem durch AT1-Rezeptorbindung mesangiale und Tubuluszellen aktiviert und interstitielle Fibroblasten zur Synthese von extrazellulärer Matrix anregt (Ruiz-Ortega und Egido 1997). Ähnlich wie im Herzen ist die Signalkaskade eng mit derjenigen von TGF-β1 verknüpft (Border und Noble 1998) und auch die von AT-II verursachte Hypertonie wirkt sich direkt auf die Niere aus (Mori und Cowley 2004). Andere Organe sind von den Auswirkungen des Hormons ebenfalls betroffen und werden auch im Kontext beispielsweise von Leber- und Lungenfibrose diskutiert (Pereira et al. 2009; Uhal et al. 2012). Daher dürfen die Individuen im Tiermodell nicht als isoliert kardial belastet angesehen werden; die Betroffenheit anderer Organe ist auch in den hier untersuchten Kohorten nicht auszuschließen. Besonders bei der Suche nach Biomarkern im Blut darf dies nicht vergessen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Mäuse zweier Versuchstierkohorten unterschiedlich lange mit AT-II behandelt. Die Applikationsdauer in der ersten Kohorte betrug 14 Tage, die in der zweiten 28 Tage. Die Ergebnisse der histologischen Auswertung zeigten, dass die vierwöchige AT-II-Gabe über das Pumpensystem ausreichte, um konsistent Herzfibrose und eine Hypertrophie von Kardiomyozyten bei den Mäusen zu induzieren, was sich mit Ergebnissen anderer Gruppen deckt (Matsui et al. 2004).

Gleichzeitig nahm die Expression von Rasal1 und Serca2b ab, während sich die Promotorbereiche der entsprechenden Gene als hypermethyliert erwiesen. Im Gegensatz zur 4-Wochen-Kohorte hatte nach 14 Tagen weder eine signifikante Fibrosierung des Herzens noch eine Promotorhypermethylierung von *Rasal1* und *Atp2a2* stattgefunden, was die Korrelation der untersuchten Gene mit Fibroseprozessen im Herzen unterstreicht. In anderen Studien konnten zu diesem Zeitpunkt bereits arterielle Hypertonie, Herzhypertrophie und -fibrose festgestellt werden (Zhang et al. 2014; Sriramula und Francis 2015). Die Gründe für diesen Sachverhalt könnten im genetischen Hintergrund, in der AT-II-Applikationsform oder anderen Umwelteinflüssen liegen.

Gänzlich der Kontrollgruppe glich die 2-Wochen-Kohorte jedoch nicht, da eine im Kontrollvergleich (nicht signifikant) verminderte Expression von Rasal1 festgestellt wurde. Offenbar markiert dieser Zeitpunkt (wenigstens in der vorliegenden Kohorte) einen Übergang, an dem zwar im Herzen noch kaum Anzeichen von Fibrose vorliegen, jedoch bestimmte funktionell entscheidende Proteine eine Negativregulation durch AT-II erfahren. Eine Promotorhypermethylierung der entsprechenden Gene spielt hier noch keine Rolle und findet - genau wie die Fibrogenese selbst - erst später (nach vierwöchiger AT-II-Applikation) statt (Abbildung 24). Sie scheint sich damit auf die Genexpression nicht initial, sondern erst nach anhaltender Belastung durch profibrotische Stimuli auszuwirken. Dieses Erklärungsmodell passt zu Ergebnissen einer Studie an Rasal1 bei Nierenfibrose (Bechtel et al. 2010). Interessanterweise hielt dort die Rasal1-Suppression auch nach Wegfall des Stressors an, sofern Promotorhypermethylierung stattgefunden hatte. Offenbar trägt dieser Mechanismus also erst nach anhaltender Belastung zur Gensuppression bei, die dann jedoch irreversibel ist - in dieser Arbeit repräsentiert durch das Auftreten von Fibrose in der 4-Wochen-Kohorte. Für Serca2 scheint dieser Zusammenhang nicht zuzutreffen, da die Histologie nach zweiwöchiger AT-II-Applikation keine Proteinsuppression zeigt. Da dies jedoch trotz Promotorhypermethylierung von Atp2a2 auch nach vier Wochen nicht der Fall ist und nur die insgesamt weit weniger stark exprimierte Isoform Serca2b supprimiert wird, scheinen hier zusätzliche Regulationsmechanismen zu greifen, welche die Serca2a-Expression schützen, bislang aber nicht bekannt sind.

Die hier erzielten Ergebnisse müssen im Bewusstsein und unter Berücksichtigung der gewählten Methoden und ihrer Limitationen betrachtet werden. So basiert natürlich die histologische Fibrosequantifizierung immer nur auf einem Querschnitt des Myokards und kann nicht sein gesamtes Volumen berücksichtigen. Auch die manuelle Raster-Auszählung der fibrotischen Fläche kann trotz der Betrachtung von jeweils zehn Gesichtsfeldern nicht das gesamte Organ abbilden. Auf die Quantifizierung der Rasal1- (und Tet3-) positiven Zellen trifft selbiges zu. Welche Art von interstitiellen Zellen sich hier durch die vorhandene Proteinexpression von Rasal1 (und Tet3) anfärben ließen, ist mit den gewählten Färbungen nicht zu differenzieren.



Abbildung 24: Schematisches Erklärungsmodell der AT-II-Applikation. Verlauf der Rasal1-Proteinexpression, kardialer Fibrose und Promotormethylierung nach AT-II-Applikation im Mausmodell.

5.2 Epigenetik und Expression von Rasal1

In der IHC-Färbung war eine Rasal1-Expression vor allem in den Interzellularräumen der Kardiomyozyten sowie perivaskulär sichtbar; die Herzmuskelzellen selbst waren kaum angefärbt. Diese Lokalisation entspricht Daten des "*Human Protein Atlas"* (The Human Protein Atlas 2017), welcher in glatter Muskulatur und Fibroblasten eine Expression von Rasal1 proklamiert, jedoch nicht in Kardiomyozyten (Uhlén et al. 2015). Daher konnte die Quantifizierung der Proteinexpression durch Zählung der interstitiellen Rasal1-positiven Zellen gelingen.

In fibrotischen Herzen wurde nach vierwöchiger AT-II-Applikation eine signifikante Abnahme der Rasal1-Expression festgestellt. Gleichzeitig wurde in denselben Herzen die aberrante Promotormethylierung von Rasal1 detektiert, welche zu einer stabilen Rasal1-Suppression führte. Diese Ergebnisse aus dem AT-II-Mausmodell decken sich mit den Vorarbeiten von Xu et al. am AAC-Mausmodell zur mechanistischen Rolle von Rasal1 bei Herzfibrose. Auch dort konnte gezeigt werden, dass kardiale Fibrose mit intrakardial gemessener Rasal1-Promotorhypermethylierung einhergeht (Xu et al. 2015).

Es bestand jedoch nicht nur ein Unterschied zwischen den Promotormethylierungs- und Proteinexpressionsgraden der erkrankten Mäuse und ihrer jeweiligen Kontrollgruppe. Es zeigte sich auch eine positive Korrelation zwischen Gewebe-*Rasal1*-5mC und Kollagen-1-positiver Fläche und dem durchschnittlichen Kardiomyozytendurchmesser, welche hier als Fibrose- bzw. Hypertrophie-

Parameter dienten. Dieses Ergebnis indiziert, dass die Rasal1-Promotormethylierung in murinem Herzgewebe als Biomarker für den Grad an kardialer Fibrose dienen kann.

5.3 Serca2-Isoformen im Kontext kardialer Fibrose

Über die Rolle der Ca²⁺-Pumpe Serca2 bei kardialer Fibrogenese ist bislang wenig bekannt. Allerdings zeigten In-vitro-Studien, dass durch therapeutische Demethylierung mit Hydralazin eine vermehrte Expression von Serca2 in Kardiomyozyten induziert werden kann (Kao et al. 2011). Diese Parallelen der Regulationsmechanismen waren Anlass, neben Rasal1 auch Serca2 im epigenetischen Kontext von Herzfibrose zu untersuchen. Entscheidend war auch die grundlegende Rolle, welche das Protein im Zellstoffwechsel von Kardiomyozyten spielt: Die Isoform Serca2a ist essentiell an der Ca²⁺-Homöostase und damit der elektromechanischen Kopplung des Herzens beteiligt. Ihre Regulierung steht daher im Zentrum der Herzinsuffizienz-Forschung (MacLennan und Kranias 2003; Lipskaia et al. 2010; Kho et al. 2012).

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass die Promotormethylierung von Atp2a2 im Tiermodell bei Herzfibrose tatsächlich zunimmt, wenn auch die Messwerte hier ebenfalls hoher Varianzen bzw. Standardabweichungen unterlagen. Ungleich den Rasal1-Ergebnissen zeigte Serca2 keine verminderte Expression. Das entspricht Ergebnissen von Studien, welche die Serca2-Expression in mit AT-II behandelten adulten murinen Kardiomyozyten auf mRNA-Ebene untersuchten (Ju et al. 1996). Bei der Betrachtung einzelner Isoformen konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch auch gezeigt werden, dass aberrante Atp2a2-Promotermethylierung zu einer transkriptionellen Suppression spezifisch von Serca2b führt, wohingegen die Isoform Serca2a im AT-II-Modell unbeeinflusst bleibt. Bisherige Studien zeigten, dass Serca2a als vorherrschende Isoform des Herzens bei kardialer Belastung verloren geht (Hasenfuss et al. 1994; Lehnart et al. 1998), wobei dieser Umstand kontrovers diskutiert wird (Movsesian et al. 1994; Hasenfuss 1998). Umso interessanter ist die hier beobachtete konsistente Serca2b-Suppression unter AT-II-Einfluss, welche in dieser Form zuvor noch nicht beschrieben wurde. Dass bei Betrachtung der Serca2-Expression weder in Histologie noch im Western Blot eine Abnahme unter AT-II erkennbar war, lässt sich durch den geringen Anteil erklären, den Serca2b an der Gesamtexpression hat. Dies wurde auf mRNA-Ebene deutlich und ist aus anderen Arbeiten bekannt (Vangheluwe et al. 2003).

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass Serca2b eine größere Rolle in der kardialen Physiologie einnimmt als bisher angenommen. Ein Hinweis dafür ist, dass im Herzen bei Überexpression von Serca2b eine Zunahme des Ca²⁺-Transports in das SR sowie eine gesteigerte Kontraktilität beobachtet werden (Greene et al. 2000). Ein weiteres Indiz ist die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Abnahme des durchschnittlichen Kardiomyozytendurchmessers nach niedrig dosierter Hydralazin-Applikation. Die Abnahme könnte durch eine Restauration von Proteinen wie Serca2b zu erklären sein, die durch Demethylierung einen Anstieg an Expression und somit Funktionalität erfahren und damit eine kompensatorische Hypertrophie reduzieren. Dass Hydralazin in der hier verwendeten Dosierung keinen Einfluss auf den arteriellen Blutdruck hat und damit dieser Effekt nicht für die Abnahme verantwortlich sein kann, wurde in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Zeisberg belegt, unter anderem an der hier betrachteten Mauskohorte. Blutdruckmessungen von Hydralazin-behandelten Mäusen ergaben im Vergleich mit der Kontrollgruppe sogar geringgradig höhere Werte (**Abbildung 8**).

Der *Atp2a2*-Promotor war in den an Fibrose erkrankten Mäusen hypermethyliert. Da sich in der Folge jedoch nur die Expression von Serca2b änderte, spricht dies für einen Mechanismus, der spezifisch die Isoform Serca2b supprimiert, während Serca2a unverändert exprimiert wird.

Die IHC-Färbung gibt Hinweise auf die Lokalisation des Serca2-Proteins, das vor allem innerhalb von Kardiomyozyten angefärbt wurde. Gleiches gilt auch für die isolierte Betrachtung von Serca2b. Dies deutet ebenfalls auf eine funktionelle Relevanz dieser Isoform in der kardialen Organfunktion hin. Schlussendlich fällt bei Betrachtung der IHC-Färbung der Serca2-Isoformen auf, dass nicht alle Kardiomyozyten gleichmäßig stark angefärbt wurden, offenbar also Expressionsunterschiede zwischen den Zellen bestehen. Ob diese funktionell bedeutend sind und ob auch andere Aspekte auf Unterschiede in Aufbau und Funktion benachbarter Kardiomyozyten hinweisen – also Subpopulationen von Herzmuskelzellen existieren, muss in Zukunft untersucht werden.

5.4 "Liquid Biopsy" als Biomarker

Biomarker gewinnen als diagnostisches Werkzeug in Forschung und Klinik zunehmend an Relevanz. Sie können zum Einsatz kommen, wenn herkömmliche Funktionsparameter aufgrund mangelnder Spezifität, bei bestehender Multimorbidität oder wegen riskanter invasiver Diagnostik an ihre Grenzen stoßen. Bei der Etablierung eines Biomarkers ist neben seiner Spezifität und Sensitivität auch die Praktikabilität der Probenentnahme von entscheidender Bedeutung. Eine Myokardbiopsie zur Gewinnung kardialer DNA-Proben erfordert den mit Risiken behafteten und aufwändigen Einsatz eines Herzkatheters, wobei entnommene Proben außerdem unter Umständen nicht das gesamte Organ repräsentieren, da Herzfibrose nicht immer gleichmäßig auftritt. Dieselbe Problematik besteht bei direkter Fibrosequantifizierung des Biopsats. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit von dem Prinzip der "Liquid Biopsy" Gebrauch gemacht. Es handelt sich dabei um die Entnahme von Blutproben zum Zweck eines diagnostischen Nachweises bestimmter Zellen oder DNA-Alterationen. Das Prinzip hat sich bisher vor allem in der Krebsforschung bewährt (Pantel et al. 2008). Freie Tumor-DNA (ctDNA) zirkuliert als Fraktion der durch Apoptose und Zelldetritus freigesetzten zellfreien DNA (cfDNA) im Blutstrom und kann dort detektiert werden (Schwarzenbach et al. 2011), wie im Mamma-, Magen- oder Lungenkarzinom bereits gezeigt werden konnte (Dawson et al. 2013; Kim K et al. 2014; Oxnard et al. 2014). Die Suche nach Biomarkern für Herzfibrose hat in den letzten Jahren durch die hohe Prävalenz chronischer Herzerkrankungen an Relevanz gewonnen, konnte jedoch noch keine durchschlagenden Erfolge verzeichnen (López et al. 2015). Lediglich bei einigen Kollagen-assoziierten Serumproteinen konnte eine Korrelation mit dem Ausmaß an Herzfibrose festgestellt werden (Klappacher et al. 1995; Querejeta et al. 2000). Dass sich quantitative Veränderungen des Epigenoms generell als Biomarker eignen, konnten frühere Studien belegen (Mikeska und Craig 2014). Besonders Unterschiede im DNA-Methylierungsstatus erwiesen sich als zweckdienlich - auch außerhalb der Onkologie in Bereichen wie der Humangenetik oder der

Fibrose-Forschung (Papageorgiou et al. 2011; Zeisberg und Zeisberg 2015). Daher fand dieses Prinzip auch hier Anwendung.

Es muss allerdings nochmals betont werden, dass die Organspezifität von Messwerten aus Blut besonders bei Erkrankungen mehrerer Organe - beeinträchtigt sein kann. Wie schon beschrieben, ist im konkreten Fall der kardialen Fibroseinduktion durch AT-II eine Beteiligung zum Beispiel der Niere möglich, welche das Ergebnis verfälschen kann und eine mögliche Fehlerquelle darstellt. Trotzdem konnten diverse Studien den erfolgreichen Einsatz des "Liquid Biopsy"-Prinzips proklamieren. In den meisten Fällen wird Serum oder Plasma als Quelle von cfDNA genutzt, um blutzelleigene DNA zu extrahieren (Gormally et al. 2007), wobei es jedoch auch dann noch zu DNA-Verunreinigung durch Zellabrieb anderer Organe kommen kann. Nachteilig ist außerdem, dass die sehr geringen Mengen an Serum- bzw. Plasma-DNA zum Teil unter der Nachweisbarkeitsgrenze liegen. Eine andere, deutlich ergiebigere DNA-Quelle sind Leukozyten. Es konnte eine positive Korrelation von globalgenomischer Methylierung im jeweils untersuchten Gewebe mit derjenigen in Leukozyten festgestellt werden (Choi et al. 2009). Allerdings ist hier auch die DNA-Menge aus anderen Zellen erhöht. Basierend auf Studien der Krebsforschung (Teschendorff et al. 2009) wurden in der vorliegenden Arbeit beide Methoden kombiniert, indem Vollblutproben eingesetzt wurden. Einen ähnlichen Ansatz wählten auch Papageorgiou et al. in ihrer Arbeit zur Pränataldiagnostik von Trisomie 21 mittels DNA-Methylierung, welche ebenfalls durch die MeDIP-Methode in Vollblutproben quantifiziert wurde (Papageorgiou et al. 2011). Wie auch in der vorliegenden Arbeit war die Verwendung von Vollblut gegenüber Plasma überlegen, da dies zum einen ausreichend hohe DNA-Mengen für die MeDIP garantierte und sie zum anderen genetisch bedingte Schwankungen in der absoluten Plasma-DNA-Menge ausglich, die andernfalls den Vergleich des Methylierungsgrades zwischen den Individuen verfälscht hätten (Patsalis 2012). Das Vorgehen diente außerdem der besseren Vergleichbarkeit der Tier- zu der Humankohorte, da bei letzterer ausschließlich gefrorenes EDTA-Vollblut zur Verfügung stand.

5.5 Etablierung eines Herzfibrose-Biomarkers im Maus- und Humanmodell

Nach vierwöchiger AT-II-Applikation im Mausmodell zeigten beide betrachteten Gene sowohl im Gewebe als auch im Blut eine im Vergleich zur Kontrollgruppe höhere Promotormethylierung. Damit war ein Zusammenhang zum Ausmaß der Herzfibrose, welche in der Fibrose-Gruppe in signifikantem Maße ausgeprägter war, zumindest wahrscheinlich. Voraussetzung für die Etablierung der Promotormethylierung von *Rasal1* und *Atp2a2* als Biomarker war jedoch die positive Korrelation des DNA-Methylierungsgrades im Herzen mit dem Ausmaß an Herzfibrose. Dafür wurden die Promotormethylierungslevel beider Gene in Gewebe-DNA mit den Fibrose-Parametern linksventrikuläre fibrotische Fläche, Kollagen-1-positive Fläche sowie dem Hypertrophie-Marker Kardiomyozytendurchmesser korreliert. In allen drei Fällen zeigte das *Rasal1*-Gen konsistent positive Korrelationen. Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass die intrakardial gemessene *Rasal1*-Promotormethylierung als Biomarker für den Grad an kardialer Fibrose dienen kann.

Auch die *Atp2a2*-Promotormethylierung erbrachte auf Ebene der Gewebe-DNA im Vergleich mit allen drei betrachteten Parametern signifikante Ergebnisse und kann aufgrund der Korrelation mit linksventrikulärer fibrotischer Fläche sowie Kollagen-1-positiver Fläche als Fibrose-Biomarker gelten.

Die Untersuchung der DNA aus den Vollblutproben bestätigte die Tauglichkeit des Rasal1-Promotors als Biomarker – zwei der drei Parameter korrelierten auch mit den im Blut gemessenen Methylierungswerten signifikant positiv. Damit kann im Blut gemessene aberrante Promotormethylierung von Rasal1 als Biomarker für Herzfibrose gelten.

Das damit im Mausmodell für beide Gene bestätigte "Liquid Biopsy"-Prinzip wurde auf humane Vollblutproben übertragen. Ob sich damit der in der Maus etablierte Biomarker auch beim Menschen verwenden lässt und eine potenzielle Alternative zur Myokardbiopsie oder aufwendigen Bildgebung darstellt, wurde hier an einer Kohorte von 38 Patienten mit HOCM geprüft. Diese Erkrankung ist eine Unterform der HCM und mit einer Versteifung des Myokards samt obstruiertem linksventrikulärem Ausflusstrakt sowie einer resultierenden Compliancestörung assoziiert, die sich in diastolischer Herzinsuffizienz äußern kann (Houston und Stevens 2015). In vielen Fällen ist dies nicht nur durch Hypertrophie, sondern auch durch kardiales Remodeling und Fibrosierung bedingt. Die HCM ist mit einer Prävalenz von 1:500 außerdem die häufigste hereditäre Erkrankung des Herzens (Maron et al. 2003), was nochmals die Relevanz Fibrose-assoziierter Erkrankungen in der Bevölkerung verdeutlicht. Der Zugang zum HOCM-Kollektiv wurde durch eine Kooperation mit der Universität Mannheim ermöglicht. Die Daten zum kardialen Fibrosegrad der Patienten wurden durch MRT-Bildgebung ermittelt: Anreicherung von Gadolinium im Bindegewebe erlaubte die Delayed Enhancement-Messung des fibrotischen Anteils in Prozent des myokardialen Gesamtvolumens. Diese Methode wird auch als late gadolinium enhancement cardiovascular magnetic resonance imaging (LGE-CMR) bezeichnet. Sie gilt als etabliertes Werkzeug für die Fibrose-Quantifizierung ischämischer Herzerkrankungen und wurde auch bei HOCM histopathologisch gesichert (Moravsky et al. 2013). Damit konnten die in den Blutproben durch MeDIP ermittelten Methylierungslevel der RASAL1und ATP2A2-Promotorbereiche wie schon im Mausmodell zum Fibrosegrad korreliert werden. Es zeigte sich bei beiden Genen ein positiver Zusammenhang, welcher für ATP2A2 signifikant war. Somit konnten die Resultate aus der Tierstudie erfolgreich auf das Humanmodell übertragen und damit auch für das HOCM-Patientenkollektiv zwei Biomarker für Herzfibrose entwickelt werden. Dass ATP2A2 hier im Gegensatz zum Mausmodell sogar der bessere Marker zu sein scheint, kann an den geringen Fallzahlen der Maus- und Patientenstudie, an speziesspezifischen Unterschieden oder an möglichen Besonderheiten der kardialen Physiologie, welche der HOCM-Kohorte eigen sind, liegen.

Andere Studien konnten zeigen, dass die durch LGE-CMR quantifizierte Herzfibrose ein unabhängiger prognostischer Marker für schwerwiegende klinische Ereignisse ist (O'Hanlon et al. 2010). Übertragen auf die Anwendung des Biomarkers hätte in der Konsequenz auch die Promotormethylierung von mindestens *ATP2A2* diese Vorhersagekraft. Diese Schlussfolgerung konnte jedoch aufgrund fehlender Follow-up-Daten nicht überprüft werden.

Besonders bei Patienten mit erhaltener Pumpfunktion scheint ein Zusammenhang zwischen Herzfibrose und Promotormethylierung zu bestehen. Die Korrelation beider Parameter ist hier am stärksten. Daher wurde eine erneute Berechnung mit einer Untergruppe der Kohorte durchgeführt, welche nur Patienten mit einer physiologischen Ejektionsfraktion von mindestens 55 Prozent einbezog (Lang et al. 2005). Für beide Gene sank der p-Wert in der Korrelation deutlich. Die enorme Signifikanzsteigerung lässt eine Präzisierung des zuvor formulierten Resümees zu: Besonders für Patienten mit erhaltener Pumpfunktion eignet sich die aberrante Promotormethylierung der Gene RASAL1 und ATP2A2 als Biomarker für kardiale Fibrose.

Nicht nur zum Ausmaß der Herzfibrose, sondern auch zur LVEF wurde die Promotormethylierung der beiden Gene korreliert. Die Ejektionsfraktion ist einer der wichtigsten kardialen Funktionsparameter und wird mittels Echokardiografie bestimmt. Eine positive Korrelation zur LVEF hieße, dass die Promotormethylierung nicht nur über Fibrosierung, sondern auch zur allgemeinen Pumpfunktion des linken Ventrikels eine Aussagekraft besäße. Ein solcher Zusammenhang konnte jedoch nicht festgestellt werden; es bestand keine signifikante Korrelation. Dies unterstreicht die Spezifität der Promotormethylierung von *RASAL1* und *ATP2A2* als Biomarker für Fibrosierungsprozesse des Herzens.

5.6 HFpEF-Patienten als mögliche Zielgruppe

Aus den Erkenntnissen der Experimente mit der HOCM-Kohorte wurde geschlussfolgert, dass sich besonders Patienten mit chronischer Herzerkrankung, jedoch erhaltener EF als profitierende Zielgruppe für den Einsatz der hier etablierten Biomarker eignen könnten. Ein Krankheitsbild, das dieser Charakteristik entspricht, ist heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF). Es handelt sich hierbei um den klinischen Symptomkomplex einer diastolischen Herzinsuffizienz bei erhaltener Pumpfunktion (meist definiert als Ejektionsfraktion ≥ 50 %) (Borlaug und Paulus 2011; Ponikowski et al. 2016). HFpEF wird von HFrEF (heart failure with reduced ejection fraction) in einer auf der EF basierten Einteilung als Unterform der Herzinsuffizienz abgegrenzt (Vasan et al. 1995), ist jedoch noch deutlich schlechter verstanden als ihr Counterpart. Die linksventrikuläre diastolische Dysfunktion als Kern der Erkrankung geht mit erhöhter Gewebesteifheit, eingeschränkter myokardialer Relaxation und Veränderungen der EZM einher (Westermann et al. 2008; Pieske 2013). Dazu zählt auch die vermehrte interstitielle EZM-Ablagerung und damit Fibrosierung des Myokards (Martos et al. 2007; Kasner et al. 2011) sowie der dezimierte Abbau von Kollagen-1 durch MMPs (Ahmed et al. 2006). An der Fibrosierung des Herzmuskels sind auch bei HFpEF-Patienten das RAAS und TGF-β1 als Modulatoren des Kollagen-Umsatzes beteiligt (Heerebeek et al. 2012). Als relevant gilt außerdem eine endotheliale Entzündungsreaktion der Koronargefäße, welche über eine verminderte Aktivität der Proteinkinase G (PKG) zur Kardiomyozytenhypertrophie und -steifheit führt (Abbildung 25) (Paulus und Tschöpe 2013). Damit unterscheidet sich die Erkrankung pathophysiologisch von HFrEF, wo Ischämie zunächst zu oxidativem Stress führt. Dieser resultiert in gesteigerter Apoptose, Nekrose und Autophagie der Kardiomyozyten, welche daraufhin durch
kollagenes Bindegewebe ersetzt werden (Hare 2001). Ein solcher Zelltod mit Ersatz durch Bindegewebe wird bei HFpEF nicht beobachtet.



Abbildung 25: Pathophysiologie des kardialen *Remodelings* bei HFpEF und HFrEF. Verschiedene Komorbiditäten induzieren eine endotheliale Entzündungsreaktion, die zur vermehrten Produktion von ROS sowie verminderter Verfügbarkeit von NO führt. Über eine Abnahme der PKG führt dies bei HFpEF zu Herzfibrose und -dysfunktion. Bei HFrEF führt primäre Kardiomyozytenschädigung zur Aktivierung von ROS und damit über Autophagie, Apoptose und Nekrose zur endothelialen und vaskulären Dysfunktion. *Abb. modifiziert nach Paulus und Tschöpe (2013)*.

HFpEF betrifft etwa die Hälfte aller Herzinsuffizienz-Patienten weltweit und weist eine ähnlich schlechte Prognose wie HFrEF auf (Hogg et al. 2004; Bhatia et al. 2006); die Mortalitätsrate ist hoch (Burkhoff 2012). Im Gegensatz zu HFrEF steigt die Prävalenz von HFpEF stetig an, während nach wie vor kaum wirksame Therapien entwickelt werden konnten und keine gesonderten Therapie-Leitlinien existieren (Owan et al. 2006; Paulus und van Ballegoij 2010; Ponikowski et al. 2016). Diese Umstände machen die Forschung an Ursachen, Diagnostik und Therapie dieses Krankheitsbilds besonders dringlich.

Da Herzfibrose und ihre molekularen Grundlagen außerdem eine große Rolle in der Pathogenese von HFpEF spielen, wäre ein nächster sinnvoller Schritt die Überprüfung der Biomarker an einem Kollektiv von Patienten mit dieser Erkrankung. Sollte der Biomarker auch bei Patienten mit HFpEF mit der Herzfibrose bzw. mit der Mortalität korrelieren, so würde eventuell eine Biomarker-basierte medikamentöse Normalisierung aberranter DNA-Methylierung auch Möglichkeiten für spezifische Therapieansätze dieser bisher unzureichend verstandenen Erkrankung eröffnen.

5.7 Therapie durch Hydralazin

Die Ergebnisse dieser Arbeit bekräftigen die Relevanz epigenetischer Veränderungen und insbesondere der aberranten Promotormethylierung als ätiologische Komponente kardialer Fibrose.

Es liegt nahe, die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen als Ansatzpunkt für zukünftige Therapien zu nutzen. In dieser Arbeit bewirkte niedrigdosiertes Hydralazin eine durch MeDIP messbare Demethylierung der Promotorregionen von *Rasal1* und *Atp2a2* sowie in der Folge einen Rückgang der durch AT-II induzierten Herzfibrose. Auch hier unterlagen die MeDIP-Ergebnisse einer hohen Streuung, sodass im Kontrollvergleich keine statistisch signifikanten Werte gemessen werden konnten. Histologie und Western Blot zeigten eine Zunahme der Rasal1- und Serca2b-Expression. Dabei war allerdings bei der Quantifizierung der Rasal1-Proteinexpression keine signifikante Zunahme der absoluten Zellzahl positiv angefärbter Fibroblasten zu beobachten. Vielmehr war ein Anstieg der Intensität einzelner Zellen sichtbar (**Abbildung 15**), was für eine vermehrte Expression des Proteins in den einzelnen Zellen spricht. Diese Zunahme konnte jedoch durch die gewählte Methode nicht erfasst werden.

Das Wirkprinzip der DNA-Demethylierung unter niedrigdosiertem Hydralazin wurde durch Tampe et al. zuerst in der Niere erforscht (Tampe et al. 2014a; Tampe et al. 2017), aber auch im Herzen konnte die Wirksamkeit demethylierender Medikamente schon bewiesen werden (Kim YS et al. 2014; Xu et al. 2015). In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt im Herzen nun auch unter Hydralazin beobachtet. Der Rückgang der *Rasal1-* und *Atp2a2-*Promotorhypermethylierung war nicht nur intrakardial, sondern auch in peripherem Blut messbar, hier auch signifikant. Diese Beobachtung stärkt gleichzeitig die Legitimität eines in Blut detektierbaren Biomarkers nach dem "*Liquid Biopsy"-*Prinzip.

Hydralazin wirkt durch 5mC-Hydroxymethylierung, welche durch das Enzym Tet3 katalysiert wird. 5hmC wird anschließend in unmodifiziertes Cytosin umgewandelt. Im Kontrollvergleich zeigte Tet3 in der Niere unter BMP7-Therapie von fibrotischen Nieren, welche gleichzeitig eine *Rasal1*-Promotorhypermethylierung aufwiesen, eine verstärkte Expression (Tampe et al. 2014b). Der gleiche Effekt wurde nach Hydralazin-Applikation beobachtet (Tampe et al. 2014a) und auch im kardialen AAC-Mausmodel führt eine Restaurierung der Tet3-Expression zu Demethylierung (Xu et al. 2015). Übereinstimmend mit diesen Vorarbeiten wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Rückgang der Tet3-Expression in fibrotischen Herzen von mit AT-II behandelten Mäusen detektiert, die nach Hydralazin-Therapie in signifikantem Maße wieder anstieg.

Diese Ergebnisse bestätigen damit die Blutdruck-unabhängige therapeutische Wirkung von Hydralazin bei Herzfibrose und bestärken die Hoffnung, den Wirkstoff in diesem Kontext auch beim Menschen eines Tages klinisch anwenden zu können.

6 Zusammenfassung

Der voranschreitende demographische Wandel unserer Gesellschaft, aber auch die rasche Entwicklung vieler Schwellenländer samt Angleichung ihres Morbiditätsprofils sind Gründe, warum chronische Herzerkrankungen auf globaler Ebene ein zunehmendes Problem darstellen und ihre weitere Erforschung für Prävention und Therapie essentiell ist. Allen voran stellt die Herzinsuffizienz ein zunehmendes medizinisches Problem unserer alternden Gesellschaft dar. Wie viele andere chronische Herzerkrankungen basiert sie auf der Pathophysiologie der Fibrogenese. Durch anhaltende Schädigungsreize wird dabei der Ras-Inhibitor RASAL1 durch aberrante Promotormethylierung seines Gens supprimiert. Fibroblasten-Aktivierung und EZM-Überproduktion sind die Folge, die Organfunktion wird eingeschränkt.

Im Zuge dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob die Rasal1-Promotormethylierung mit dem Grad an Herzfibrose korreliert und ob die aus Blut gewonnenen Messwerte damit als Biomarker für kardiale Fibrose infrage kommen. Auch Atp2a2 als das Gen der herzphysiologisch essenziellen Ca²⁺-ATPase Serca2 sollte hinsichtlich des Zusammenhangs zur Herzfibrose epigenetisch untersucht werden. Experimentell wurde beides am AT-II-Mausmodell überprüft, nachdem sich eine vierwöchige Applikation des Hormons im Gegensatz zur zweiwöchigen Gabe als konsistenter Fibrose-Induktor erwiesen hatte. Beide Gene zeigten in Gewebe und Blut der erkrankten Mäuse eine zur Kontrollgruppe korrelierte Promotorhypermethylierung. In der direkten interindividuellen Korrelation erwies sich Rasal1 zum histologisch erhobenen Fibrose-Parameter "Kollagen-1-positive Fläche" als signifikant, was seine zuvor hypothetisierte Funktion als Biomarker bestätigte. Die Quantifizierung der Proteinexpression zeigte, dass Rasal1 bei aberranter Methylierung seines Promotors zurückging, nicht jedoch Serca2 bei Atp2a2-Hypermehylierung. Bei Differenzierung der Isoformen wurde deutlich, dass die Serca2a-Expression unverändert blieb und nur die deutlich geringer exprimierte Serca2b-Isoform supprimiert wurde – ein bislang unbeobachteter Umstand.

Die Überprüfung des Biomarkers beim Menschen gelang durch die Testung von 38 HOCM-Patienten, deren *RASAL1-* und *ATP2A2-*Promotormethylierung mit ihrem durch MRT ermittelten Fibrosegrad korrelierten – unselektioniert jedoch nur für *ATP2A2* in signifikantem Ausmaß. Die Eingrenzung des Kollektivs auf Patienten mit einer EF > 55 % erbrachte bei Betrachtung beider Gene eine erhebliche Signifikanzsteigerung. Daraus wurde geschlussfolgert, dass beide Biomarker besonders gut auf Patienten mit einer physiologischen EF anwendbar sind. Ein nächster Schritt wäre damit die Überprüfung der Biomarker an einem entsprechenden Patientenkollektiv, das später als Zielgruppe profitieren könnte. HFpEF – gekennzeichnet durch kardiale Fibrosierung bei erhaltener EF – kommt als eine solche Erkrankung infrage, weshalb die Forschung an dieser Form der Herzinsuffizienz eine Zukunftsperspektive für weitere Experimente auf Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit bietet.

Schließlich wurde anhand einer weiteren Kohorte des AT-II-Mausmodells ein kausaltherapeutischer Ansatz überprüft. Dazu wurde den Tieren der Wirkstoff Hydralazin verabreicht. In hohen Dosen blutdrucksenkend hatte er in der verwendeten geringen Konzentration von 5 mg/kg KG/Tag eine demethylierende Wirkung, welche zuvor bereits in der Niere beobachtet worden war. Der Rasal1und Atp2a2-Promotorhypermethylierung entgegenwirkend wurde die konsekutive Restaurierung der Proteinexpression sowie ein im Vergleich zu den mit reinem AT-II behandelten Mäusen reduzierter Fibrosegrad beobachtet. Auch die Expression des für die Demethylierung entscheidenden Enzyms Tet3 stieg nach Hydralazin-Applikation wieder an. Damit konnte die Wirksamkeit dieses Wirkstoffs nun auch bei Herzfibrose bestätigt werden.

7 Anhang

Patienten-Nr.	Geschlecht	Alter	LVEF [%]	Gesamtausmaß an <i>delayed enhancement</i> als [%] des totalen Myokardvolumens	Fibrose (ja=1, nein=0)
1	m	55	73	10,29411765	1
2	m	63	68	13,23529412	1
3	W	80		0	0
4	m	51	56	30,88235294	1
5	W	68	64	17,64705882	1
6	m	47	64	11,76470588	1
8	m	58		0	0
9	W	55	61	5,882352941	1
10	m	53	69	22,05882353	1
11	W	72	71	4,411764706	1
12	W	56	44	38,23529412	1
13	W	65	54	26,47058824	1
14	m	51	66	2,941176471	1
15	m	67	60	4,3	1
17	m	65	49	11,76470588	1
18	m	80	64	0	0
19	m	50	45	7,352941176	1
20	m	43	31	6,3	1
21	m	38	62	42,64705882	1
22	m	46	49	0	0
23	m	71	64	1,3	1

Tabelle 8: Patientenkohorte mit HOCM inklusive Kontrollen. Die Daten wurden in dieser Form von Herrn Prof. Dr. Borggrefe, Direktor der Klinik für Kardiologie der Universitätsmedzin Mannheim, überliefert. Bei Patient Nr. 7 lagen keine Daten zum Fibrosegrad vor, bei Patient Nr. 16 lag keine Blutprobe vor.

Patienten-Nr.	Geschlecht	Alter	LVEF [%]	Gesamtausmaß an <i>delayed enhancement</i> als [%] des totalen Myokardvolumens	Fibrose (ja=1, nein=0)
24				3,3	1
25	m	74	64	1,4	1
26	W	61	65	0	0
27	m	55	71	0	0
28	m	71	52	15,6	1
29	m	67	69	0	0
30	m	21	61	0	0
31	W	17	68	0	0
33	m	60	85	0	0
34	m	76		2,1	1
35	W	80	56	0	0
36	W	67	57	17,64705882	1
37	W	51		0	0
38	m	63	51	27,94117647	1
39	w	71	69	0	0
40	m	63	53	8,823529412	1

8 Literaturverzeichnis

8.1 Zeitschriftenartikel

- Ahmed SH, Clark LL, Pennington WR, Webb CS, Bonnema DD, Leonardi AH, McClure CD, Spinale FG, Zile MR (2006): Matrix Metalloproteinases/Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. Circulation <u>113</u>, 2089–2096
- Annes JP, Munger JS, Rifkin DB (2003): Making sense of latent TGFβ activation. J Cell Sci <u>116</u>, 217–224
- Asahi M, Sugita Y, Kurzydlowski K, De Leon S, Tada M, Toyoshima C, MacLennan DH (2003): Sarcolipin regulates sarco(endo)plasmic reticulum Ca2+-ATPase (SERCA) by binding to transmembrane helices alone or in association with phospholamban. Proc Natl Acad Sci USA <u>100</u>, 5040–5045
- Asahi M, Otsu K, Nakayama H, Hikoso S, Takeda T, Gramolini AO, Trivieri MG, Oudit GY, Morita T, Kusakari Y, et al. (2004): Cardiac-specific overexpression of sarcolipin inhibits sarco(endo)plasmic reticulum Ca2+ ATPase (SERCA2a) activity and impairs cardiac function in mice. Proc Natl Acad Sci USA <u>101</u>, 9199–9204
- Asbun J, Villarreal FJ (2006): The pathogenesis of myocardial fibrosis in the setting of diabetic cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol <u>47</u>, 693–700
- Ashrafian H, McKenna WJ, Watkins H (2011): Disease Pathways and Novel Therapeutic Targets in Hypertrophic Cardiomyopathy. Circ Res <u>109</u>, 86–96
- Baicu CF, Stroud JD, Livesay VA, Hapke E, Holder J, Spinale FG, Zile MR (2003): Changes in extracellular collagen matrix alter myocardial systolic performance. Am J Physiol Heart Circ Physiol <u>284</u>, H122-132
- Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, Borg TK, Baudino TA (2007): Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. Am J Physiol Heart Circ Physiol <u>293</u>, H1883-1891
- Bechtel W, McGoohan S, Zeisberg EM, Müller GA, Kalbacher H, Salant DJ, Müller CA, Kalluri R, Zeisberg M (2010): Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. Nat Med <u>16</u>, 544–550
- Beltrami CA, Finato N, Rocco M, Feruglio GA, Puricelli C, Cigola E, Quaini F, Sonnenblick EH, Olivetti G, Anversa P (1994): Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans. Circulation <u>89</u>, 151–163
- Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S (2007): ECM remodeling in hypertensive heart disease. J Clin Invest <u>117</u>, 568–575
- Bhatia RS, Tu JV, Lee DS, Austin PC, Fang J, Haouzi A, Gong Y, Liu PP (2006): Outcome of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction in a Population-Based Study. N Engl J Med <u>355</u>, 260–269

- Bird AP, Wolffe AP (1999): Methylation-Induced Repression— Belts, Braces, and Chromatin. Cell <u>99</u>, 451–454
- Border WA, Noble NA (1998): Interactions of Transforming Growth Factor-β and Angiotensin II in Renal Fibrosis. Hypertension <u>31</u>, 181–188
- Borer JS, Truter S, Herrold EM, Falcone DJ, Pena M, Carter JN, Dumlao TF, Lee JA, Supino PG (2002): Myocardial fibrosis in chronic aortic regurgitation: molecular and cellular responses to volume overload. Circulation <u>105</u>, 1837–1842
- Borlaug BA, Paulus WJ (2011): Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment. Eur Heart J <u>32</u>, 670–679
- Brasier AR, Recinos A, Eledrisi MS (2002): Vascular Inflammation and the Renin-Angiotensin System. Arterioscler Thromb Vasc Biol <u>22</u>, 1257–1266
- Bui AL, Horwich TB, Fonarow GC (2011): Epidemiology and risk profile of heart failure. Nat Rev Cardiol <u>8</u>, 30–41
- Bujak M, Dobaczewski M, Chatila K, Mendoza LH, Li N, Reddy A, Frangogiannis NG (2008): Interleukin-1 Receptor Type I Signaling Critically Regulates Infarct Healing and Cardiac Remodeling. Am J Pathol <u>173</u>, 57–67
- Burkhoff D (2012): Mortality in heart failure with preserved ejection fraction: an unacceptably high rate. Eur Heart J <u>33</u>, 1718–1720
- Campbell SE, Katwa LC (1997): Angiotensin II Stimulated Expression of Transforming Growth Factor-β1in Cardiac Fibroblasts and Myofibroblasts. J Mol Cell Cardiol <u>29</u>, 1947–1958
- Cheng T-H, Cheng P-Y, Shih N-L, Chen I-B, Wang DL, Chen J-J (2003): Involvement of reactive oxygen species in angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression in rat cardiac fibroblasts. J Am Coll Cardiol <u>42</u>, 1845–1854
- Choi J-Y, James SR, Link PA, McCann SE, Hong C-C, Davis W, Nesline MK, Ambrosone CB, Karpf AR (2009): Association between global DNA hypomethylation in leukocytes and risk of breast cancer. Carcinogenesis <u>30</u>, 1889–1897
- Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem <u>162</u>, 156–159
- Christman JK (2002): 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. Oncogene <u>21</u>, 5483–5495
- Clarkson PB, Wheeldon NM, MacLeod C, Tennent M, MacDonald TM (1994): Effects of angiotensin II and aldosterone on diastolic function in vivo in normal man. Clin Sci (Lond) <u>87</u>, 397–401
- Crowley SD, Gurley SB, Herrera MJ, Ruiz P, Griffiths R, Kumar AP, Kim H-S, Smithies O, Le TH, Coffman TM (2006): Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. Proc Natl Acad Sci USA <u>103</u>, 17985–17990
- Das PM, Singal R (2004): DNA methylation and cancer. J Clin Oncol 22, 4632-4642

- Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin S-F, Dunning MJ, Gale D, Forshew T, Mahler-Araujo B, et al. (2013): Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. N Engl J Med <u>368</u>, 1199–1209
- Dobaczewski M, Frangogiannis NG (2009): Chemokines and cardiac fibrosis. Front Biosci (Schol Ed) <u>1</u>, 391–405
- Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG (2011): Transforming growth factor (TGF)-β signaling in cardiac remodeling. J Mol Cell Cardiol <u>51</u>, 600–606
- Downward J (2003): Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. Nat Rev Cancer 3, 11-22
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA (2004): Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. Nature <u>429</u>, 457–463
- Engvall E, Perlmann P (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry <u>8</u>, 871–874
- Estécio MRH, Issa J-PJ (2011): Dissecting DNA hypermethylation in cancer. FEBS Lett <u>585</u>, 2078–2086
- Farag M, Mabote T, Shoaib A, Zhang J, Nabhan AF, Clark AL, Cleland JG (2015): Hydralazine and nitrates alone or combined for the management of chronic heart failure: A systematic review. Int J Cardiol <u>196</u>, 61–69
- Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, Schoch R, Gattermann N, Sanz G, List A, et al. (2009): Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. Lancet Oncol <u>10</u>, 223–232
- Francis SE, Holden H, Holt CM, Duff GW (1998): Interleukin-1 in myocardium and coronary arteries of patients with dilated cardiomyopathy. J Mol Cell Cardiol <u>30</u>, 215–223
- Frangogiannis NG (2012): Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. Circ Res <u>110</u>, 159–173
- Frank KF, Bölck B, Brixius K, Kranias EG, Schwinger RHG (2002): Modulation of SERCA: implications for the failing human heart. Basic Res Cardiol <u>97</u>, 172–178
- Gabbiani G, Ryan GB, Majno G (1971): Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. Experientia <u>27</u>, 549–550
- Gao X, He X, Luo B, Peng L, Lin J, Zuo Z (2009): Angiotensin II increases collagen I expression via transforming growth factor-beta1 and extracellular signal-regulated kinase in cardiac fibroblasts. Eur J Pharmacol <u>606</u>, 115–120
- Gélébart P, Martin V, Enouf J, Papp B (2003): Identification of a new SERCA2 splice variant regulated during monocytic differentiation. Biochem Biophys Res Commun <u>303</u>, 676–684
- González A, Schelbert EB, Díez J, Butler J (2018): Myocardial Interstitial Fibrosis in Heart Failure: Biological and Translational Perspectives. J Am Coll Cardiol <u>71</u>, 1696–1706
- Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P (2007): Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: Practical aspects and biological significance. Mutat Res Mutat Res <u>635</u>, 105–117

- Greene AL, Lalli MJ, Ji Y, Babu GJ, Grupp I, Sussman M, Periasamy M (2000): Overexpression of SERCA2b in the Heart Leads to an Increase in Sarcoplasmic Reticulum Calcium Transport Function and Increased Cardiac Contractility. J Biol Chem <u>275</u>, 24722–24727
- Grimaldi V, De Pascale MR, Zullo A, Soricelli A, Infante T, Mancini FP, Napoli C (2017): Evidence of epigenetic tags in cardiac fibrosis. J Cardiol <u>69</u>, 401–408
- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT (2008): Wound repair and regeneration. Nature <u>453</u>, 314–321
- Harada K, Komuro I, Shiojima I, Hayashi D, Kudoh S, Mizuno T, Kijima K, Matsubara H, Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y (1998): Pressure Overload Induces Cardiac Hypertrophy in Angiotensin II Type 1A Receptor Knockout Mice. Circulation <u>97</u>, 1952–1959
- Hare JM (2001): Oxidative Stress and Apoptosis in Heart Failure Progression. Circ Res 89, 198-200
- Hasenfuss G (1998): Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. Cardiovasc Res <u>37</u>, 279–289
- Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, Drexler H (1994): Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. Circ Res <u>75</u>, 434–442
- Hashimoto N, Phan SH, Imaizumi K, Matsuo M, Nakashima H, Kawabe T, Shimokata K, Hasegawa Y (2010): Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol <u>43</u>, 161–172
- Heerebeek L van, Franssen CPM, Hamdani N, Verheugt FWA, Somsen GA, Paulus WJ (2012): Molecular and Cellular Basis for Diastolic Dysfunction. Curr Heart Fail Rep <u>9</u>, 293–302
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (1997): TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. Nature <u>390</u>, 465–471
- Hellman A, Chess A (2007): Gene body-specific methylation on the active X chromosome. Science <u>315</u>, 1141–1143
- Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, Saito Y, Johnson RS, Kretzler M, Cohen CD, et al. (2007): Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. J Clin Invest <u>117</u>, 3810–3820
- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmoulière A, Varga J, De Wever O, Mareel M, Gabbiani G (2012): Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. Am J Pathol <u>180</u>, 1340–1355
- Hogg K, Swedberg K, McMurray J (2004): Heart failure with preserved left ventricular systolic function: epidemiology, clinical characteristics, and prognosis. J Am Coll Cardiol <u>43</u>, 317–327
- Houston BA, Stevens GR (2015): Hypertrophic Cardiomyopathy: A Review. Clin Med Insights Cardiol <u>8</u>, 53–65
- Ichihara S, Senbonmatsu T, Price E, Ichiki T, Gaffney FA, Inagami T (2001): Angiotensin II Type 2 Receptor Is Essential for Left Ventricular Hypertrophy and Cardiac Fibrosis in Chronic Angiotensin II–Induced Hypertension. Circulation <u>104</u>, 346–351

- James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J, Lackland DT, LeFevre ML, MacKenzie TD, Ogedegbe O, et al. (2014): 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). JAMA <u>311</u>, 507–520
- Janicki JS, Brower GL (2002): The role of myocardial fibrillar collagen in ventricular remodeling and function. J Card Fail <u>8</u>, S319–S325
- Ju H, Scammell-La Fleur T, Dixon IMC (1996): Altered mRNA Abundance of Calcium Transport Genes in Cardiac Myocytes Induced by Angiotensin II. J Mol Cell Cardiol <u>28</u>, 1119–1128
- Kalluri R, Weinberg RA (2009): The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest <u>119</u>, 1420–1428
- Kao Y-H, Chen Y-C, Cheng C-C, Lee T-I, Chen Y-J, Chen S-A (2010): Tumor necrosis factoralpha decreases sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPase expressions via the promoter methylation in cardiomyocytes. Crit Care Med <u>38</u>, 217–222
- Kao Y-H, Cheng C-C, Chen Y-C, Chung C-C, Lee T-I, Chen S-A, Chen Y-J (2011): Hydralazineinduced promoter demethylation enhances sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPase and calcium homeostasis in cardiac myocytes. Lab Invest <u>91</u>, 1291–1297
- Kasner M, Westermann D, Lopez B, Gaub R, Escher F, Kühl U, Schultheiss H-P, Tschöpe C (2011): Diastolic Tissue Doppler Indexes Correlate With the Degree of Collagen Expression and Cross-Linking in Heart Failure and Normal Ejection Fraction. J Am Coll Cardiol <u>57</u>, 977– 985
- Kho C, Lee A, Hajjar RJ (2012): Altered sarcoplasmic reticulum calcium cycling—targets for heart failure therapy. Nat Rev Cardiol <u>9</u>, 717–733
- Kim K, Shin DG, Park MK, Baik SH, Kim TH, Kim S, Lee S (2014): Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection. Ann Surg Treat Res <u>86</u>, 136–142
- Kim S, Iwao H (2000): Molecular and Cellular Mechanisms of Angiotensin II-Mediated Cardiovascular and Renal Diseases. Pharmacol Rev <u>52</u>, 11–34
- Kim YS, Kang WS, Kwon JS, Hong MH, Jeong H, Jeong HC, Jeong MH, Ahn Y (2014): Protective role of 5-azacytidine on myocardial infarction is associated with modulation of macrophage phenotype and inhibition of fibrosis. J Cell Mol Med <u>18</u>, 1018–1027
- Kimura T, Nakamori M, Lueck JD, Pouliquin P, Aoike F, Fujimura H, Dirksen RT, Takahashi MP, Dulhunty AF, Sakoda S (2005): Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase in myotonic dystrophy type
 1. Hum Mol Genet <u>14</u>, 2189–2200
- Klappacher G, Franzen P, Haab D, Mehrabi M, Binder M, Plesch K, Pacher R, Grimm M, Pribill I, Eichler H-G, Glogar HD (1995): Measuring extracellular matrix turnover in the serum of patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy and impact on diagnosis and prognosis. Am J Cardiol <u>75</u>, 913–918

- Kong P, Christia P, Frangogiannis NG (2014): The pathogenesis of cardiac fibrosis. Cell Mol Life Sci <u>71</u>, 549–574
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature <u>227</u>, 680–685
- Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise JS, et al. (2005): Recommendations for Chamber Quantification: A Report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, Developed in Conjunction with the European Association of Echocardiography, a Branch of the European Society of Cardiology. J Am Soc Echocardiogr <u>18</u>, 1440–1463
- Leask A (2010): Potential Therapeutic Targets for Cardiac Fibrosis. Circ Res 106, 1675–1680
- Leask A, Abraham DJ (2004): TGF-β signaling and the fibrotic response. FASEB J 18, 816–827
- Lehnart SE, Schillinger W, Pieske B, Prestle J, Just H, Hasenfuss G (1998): Sarcoplasmic Reticulum Proteins in Heart Failure. Ann N Y Acad Sci <u>853</u>, 220–230
- Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KKL, Murabito JM, Vasan RS (2002): Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. N Engl J Med <u>347</u>, 1397–1402
- Lijnen P, Petrov V (2000): Induction of Cardiac Fibrosis by Aldosterone. J Mol Cell Cardiol <u>32</u>, 865–879
- Lipskaia L, Chemaly ER, Hadri L, Lompre A-M, Hajjar RJ (2010): Sarcoplasmic reticulum Ca2+ ATPase as a therapeutic target for heart failure. Expert Opin Biol Ther <u>10</u>, 29–41
- Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB, Murabito JM, Vasan RS, Benjamin EJ, Levy D, Framingham Heart Study (2002): Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. Circulation <u>106</u>, 3068–3072
- López B, González A, Ravassa S, Beaumont J, Moreno MU, San José G, Querejeta R, Díez J (2015): Circulating Biomarkers of Myocardial Fibrosis: The Need for a Reappraisal. J Am Coll Cardiol <u>65</u>, 2449–2456
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem <u>193</u>, 265–275
- Lukashev ME, Werb Z (1998): ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. Trends Cell Biol <u>8</u>, 437–441
- Lytton J, Zarain-Herzberg A, Periasamy M, MacLennan DH (1989): Molecular cloning of the mammalian smooth muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca2+-ATPase. J Biol Chem <u>264</u>, 7059–7065
- MacLennan DH, Kranias EG (2003): Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. Nat Rev Mol Cell Biol <u>4</u>, 566–577
- Maron BJ, McKenna WJ, Danielson GK, Kappenberger LJ, Kuhn HJ, Seidman CE, Shah PM, Spencer WH, Spirito P, Cate T, et al. (2003): American College of Cardiology/European Society of Cardiology Clinical Expert Consensus Document on Hypertrophic

Cardiomyopathy: A report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. Eur Heart J <u>24</u>, 1965–1991

- Martos R, Baugh J, Ledwidge M, O'Loughlin C, Conlon C, Patle A, Donnelly SC, McDonald K (2007): Diastolic Heart Failure. Circulation <u>115</u>, 888–895
- Matsui Y, Jia N, Okamoto H, Kon S, Onozuka H, Akino M, Liu L, Morimoto J, Rittling SR, Denhardt D, et al. (2004): Role of osteopontin in cardiac fibrosis and remodeling in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. Hypertension <u>43</u>, 1195–1201
- Mikeska T, Craig JM (2014): DNA Methylation Biomarkers: Cancer and Beyond. Genes 5, 821-864
- Moravsky G, Ofek E, Rakowski H, Butany J, Williams L, Ralph-Edwards A, Wintersperger BJ, Crean A (2013): Myocardial Fibrosis in Hypertrophic Cardiomyopathy. JACC Cardiovasc Imaging <u>6</u>, 587–596
- Mori T, Cowley AW (2004): Role of Pressure in Angiotensin II-Induced Renal Injury. Hypertension <u>43</u>, 752–759
- Movsesian MA, Karimi M, Green K, Jones LR (1994): Ca(2+)-transporting ATPase, phospholamban, and calsequestrin levels in nonfailing and failing human myocardium. Circulation <u>90</u>, 653–657
- Neary R, Watson CJ, Baugh JA (2015): Epigenetics and the overhealing wound: the role of DNA methylation in fibrosis. Fibrogenesis Tissue Repair <u>8</u>, 18
- Neumann T, Biermann J, Erbel R, Neumann A, Wasem J, Ertl G, Dietz R (2009): Heart Failure: the Commonest Reason for Hospital Admission in Germany. Dtsch Ärztebl Int <u>106</u>, 269–275
- O'Hanlon R, Grasso A, Roughton M, Moon JC, Clark S, Wage R, Webb J, Kulkarni M, Dawson D, Sulaibeekh L, et al. (2010): Prognostic Significance of Myocardial Fibrosis in Hypertrophic Cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol <u>56</u>, 867–874
- Ohtsu H, Frank GD, Utsunomiya H, Eguchi S (2005): Redox-dependent protein kinase regulation by angiotensin II: mechanistic insights and its pathophysiology. Antioxid Redox Signal <u>7</u>, 1315–1326
- O'Reilly S (2017): Epigenetics in fibrosis. Mol Aspects Med 54, 89-102
- Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM (2006): Trends in Prevalence and Outcome of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. N Engl J Med 355, 251–259
- Oxnard GR, Paweletz CP, Kuang Y, Mach SL, O'Connell A, Messineo MM, Luke JJ, Butaney M, Kirschmeier P, Jackman DM, Jänne PA (2014): Noninvasive Detection of Response and Resistance in EGFR-Mutant Lung Cancer Using Quantitative Next-Generation Genotyping of Cell-Free Plasma DNA. Clin Cancer Res <u>20</u>, 1698–1705
- Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B (2008): Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. Nat Rev Cancer <u>8</u>, 329–340

- Papageorgiou EA, Karagrigoriou A, Tsaliki E, Velissariou V, Carter NP, Patsalis PC (2011): Fetalspecific DNA methylation ratio permits non-invasive prenatal diagnosis of trisomy 21. Nat Med <u>17</u>, 510–513
- Patsalis PC (2012): Reply to: Technical concerns about immunoprecipitation of methylated fetal DNA for noninvasive trisomy 21 diagnosis. Nat Med <u>18</u>, 1328–1329
- Paulus WJ, van Ballegoij JJM (2010): Treatment of Heart Failure With Normal Ejection Fraction: An Inconvenient Truth! J Am Coll Cardiol <u>55</u>, 526–537
- Paulus WJ, Tschöpe C (2013): A Novel Paradigm for Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: Comorbidities Drive Myocardial Dysfunction and Remodeling Through Coronary Microvascular Endothelial Inflammation. J Am Coll Cardiol <u>62</u>, 263–271
- Pereira RM, dos Santos RAS, da Costa Dias FL, Teixeira MM, Simoes e Silva AC (2009): Reninangiotensin system in the pathogenesis of liver fibrosis. World J Gastroenterol <u>15</u>, 2579–2586
- Periasamy M, Huke S (2001): SERCA pump level is a critical determinant of Ca(2+)homeostasis and cardiac contractility. J Mol Cell Cardiol <u>33</u>, 1053–1063
- Periasamy M, Bhupathy P, Babu GJ (2008): Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca2+ ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. Cardiovasc Res <u>77</u>, 265–273
- Piek E, Heldin CH, Ten Dijke P (1999): Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. FASEB J <u>13</u>, 2105–2124
- Pieske BM (2013): Can understanding of the pathophysiological mechanisms of heart failure with preserved ejection fraction lead to better patient phenotyping? Dialogues Cardiovasc Med <u>18</u>, 225–233
- Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola V-P, Jankowska EA, et al. (2016): 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC): Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. Eur Heart J <u>37</u>, 2129–2200
- Querejeta R, Varo N, López B, Larman M, Artiñano E, Etayo JC, Ubago JLM, Gutierrez-Stampa M, Emparanza JI, Gil MJ, et al. (2000): Serum Carboxy-Terminal Propeptide of Procollagen Type I Is a Marker of Myocardial Fibrosis in Hypertensive Heart Disease. Circulation <u>101</u>, 1729–1735
- Regan CP, Anderson PG, Bishop SP, Berecek KH (1997): Pressure-independent effects of AT1receptor antagonism on cardiovascular remodeling in aortic-banded rats. Am J Physiol <u>272</u>, H2131–H2138
- Regan JA, Mauro AG, Carbone S, Marchetti C, Gill R, Mezzaroma E, Raleigh JV, Salloum FN, Tassell BWV, Abbate A, Toldo S (2015): A mouse model of heart failure with preserved ejection fraction due to chronic infusion of a low subpressor dose of angiotensin II. Am J Physiol <u>309</u>, H771–H778

- Rieder F, Kessler SP, West GA, Bhilocha S, de la Motte C, Sadler TM, Gopalan B, Stylianou E, Fiocchi C (2011): Inflammation-Induced Endothelial-to-Mesenchymal Transition. Am J Pathol <u>179</u>, 2660–2673
- Ruiz-Ortega M, Egido J (1997): Angiotensin II modulates cell growth-related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts. Kidney Int <u>52</u>, 1497–1510
- Sadoshima J, Izumo S (1993): Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. Circ Res <u>73</u>, 413–423
- Schellings MWM, Vanhoutte D, Almen GC van, Swinnen M, Leenders JJG, Kubben N, Leeuwen REW van, Hofstra L, Heymans S, Pinto YM (2010): Syndecan-1 Amplifies Angiotensin II– Induced Cardiac Fibrosis. Hypertension <u>55</u>, 249–256
- Schmieder RE, Hilgers KF, Schlaich MP, Schmidt BM (2007): Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. Lancet <u>369</u>, 1208–1219
- Schultz JEJ, Witt SA, Glascock BJ, Nieman ML, Reiser PJ, Nix SL, Kimball TR, Doetschman T (2002): TGF-β1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. J Clin Invest <u>109</u>, 787–796
- Schulz WA, Steinhoff C, Florl AR (2006): Methylation of endogenous human retroelements in health and disease. Curr Top Microbiol Immunol <u>310</u>, 211–250
- Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS, Hirsch AT, Apstein CS, Lorell BH (1990): Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. J Clin Invest <u>86</u>, 1913–1920
- Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K (2011): Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. Nat Rev Cancer <u>11</u>, 426–437
- Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS (2001): Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. Am J Physiol Cell Physiol <u>280</u>, C53-60
- Smith BD, Beach CL, Mahmoud D, Weber L, Henk HJ (2014): Survival and hospitalization among patients with acute myeloid leukemia treated with azacitidine or decitabine in a large managed care population: a real-world, retrospective, claims-based, comparative analysis. Exp Hematol Oncol <u>3</u>, 10
- Spinale FG (2007): Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. Physiol Rev <u>87</u>, 1285–1342
- Sriramula S, Francis J (2015): Tumor Necrosis Factor Alpha Is Essential for Angiotensin II-Induced Ventricular Remodeling: Role for Oxidative Stress. PloS One <u>10</u>, e0138372
- Takata A, Otsuka M, Kishikawa T, Yamagami M, Ishibashi R, Sekiba K, Suzuki T, Ohno M, Yamashita Y, Abe T, et al. (2017): RASAL1 is a potent regulator of hepatic stellate cell activity and liver fibrosis. Oncotarget <u>8</u>, 64840–64852

- Tampe B, Tampe D, Zeisberg EM, Müller GA, Bechtel-Walz W, Koziolek M, Kalluri R, Zeisberg M (2014a): Induction of Tet3-dependent Epigenetic Remodeling by Low-dose Hydralazine Attenuates Progression of Chronic Kidney Disease. EBioMedicine <u>2</u>, 19–36
- Tampe B, Tampe D, Müller CA, Sugimoto H, LeBleu V, Xu X, Müller GA, Zeisberg EM, Kalluri R, Zeisberg M (2014b): Tet3-Mediated Hydroxymethylation of Epigenetically Silenced Genes Contributes to Bone Morphogenic Protein 7-Induced Reversal of Kidney Fibrosis. J Am Soc Nephrol <u>25</u>, 905–912
- Tampe B, Steinle U, Tampe D, Carstens JL, Korsten P, Zeisberg EM, Müller GA, Kalluri R, Zeisberg M (2017): Low-dose hydralazine prevents fibrosis in a murine model of acute kidney injury–to–chronic kidney disease progression. Kidney Int <u>91</u>, 157–176
- Tao H, Huang C, Yang J-J, Ma T-T, Bian E-B, Zhang L, Lv X-W, Jin Y, Li J (2011): MeCP2 controls the expression of RASAL1 in the hepatic fibrosis in rats. Toxicology <u>290</u>, 327–333
- Tao H, Yang J-J, Chen Z-W, Xu S-S, Zhou X, Zhan H-Y, Shi K-H (2014): DNMT3A silencing RASSF1A promotes cardiac fibrosis through upregulation of ERK1/2. Toxicology <u>323</u>, 42–50
- Tao H, Song Z-Y, Ding X-S, Yang J-J, Shi K-H, Li J (2018): Epigenetic signatures in cardiac fibrosis, special emphasis on DNA methylation and histone modification. Heart Fail Rev <u>23</u>, 789-799
- Teschendorff AE, Menon U, Gentry-Maharaj A, Ramus SJ, Gayther SA, Apostolidou S, Jones A, Lechner M, Beck S, Jacobs IJ, Widschwendter M (2009): An epigenetic signature in peripheral blood predicts active ovarian cancer. PloS One <u>4</u>, e8274
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA (2002): Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol <u>3</u>, 349–363
- Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, Mann DL (1996): Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. Circulation <u>93</u>, 704–711
- Uhal BD, Li X, Piasecki CC, Molina-Molina M (2012): ANGIOTENSIN SIGNALLING IN PULMONARY FIBROSIS. Int J Biochem Cell Biol <u>44</u>, 465–468
- Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjöstedt E, Asplund A, et al. (2015): Tissue-based map of the human proteome. Science <u>347</u>, 1260419
- Van Weemen BK, Schuurs AH (1971): Immunoassay using antigen—enzyme conjugates. FEBS Lett <u>15</u>, 232–236
- Vandecaetsbeek I, Trekels M, Maeyer MD, Ceulemans H, Lescrinier E, Raeymaekers L, Wuytack F, Vangheluwe P (2009): Structural basis for the high Ca2+ affinity of the ubiquitous SERCA2b Ca2+ pump. Proc Natl Acad Sci USA <u>106</u>, 18533–18538
- Vandecaetsbeek I, Vangheluwe P, Raeymaekers L, Wuytack F, Vanoevelen J (2011): The Ca2+ Pumps of the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus. Cold Spring Harb Perspect Biol <u>3</u>, a004184

- Vangheluwe P, Louch WE, Ver Heyen M, Sipido K, Raeymaekers L, Wuytack F (2003): Ca2+ transport ATPase isoforms SERCA2a and SERCA2b are targeted to the same sites in the murine heart. Cell Calcium <u>34</u>, 457–464
- Vasan RS, Benjamin EJ, Levy D (1995): Prevalence, clinical features and prognosis of diastolic heart failure: An epidemiologic perspective. J Am Coll Cardiol <u>26</u>, 1565–1574
- Verboomen H, Wuytack F, Smedt HD, Himpens B, Casteels R (1992): Functional difference between SERCA2a and SERCA2b Ca2+ pumps and their modulation by phospholamban. Biochem J <u>286</u>, 591–595
- Walker SA, Kupzig S, Bouyoucef D, Davies LC, Tsuboi T, Bivona TG, Cozier GE, Lockyer PJ, Buckler A, Rutter GA, et al. (2004): Identification of a Ras GTPase-activating protein regulated by receptor-mediated Ca2+ oscillations. EMBO J <u>23</u>, 1749–1760
- Watson CJ, Collier P, Tea I, Neary R, Watson JA, Robinson C, Phelan D, Ledwidge MT,
 McDonald KM, McCann A, et al. (2014): Hypoxia-induced epigenetic modifications are associated with cardiac tissue fibrosis and the development of a myofibroblast-like phenotype. Hum Mol Genet <u>23</u>, 2176–2188
- Weber KT (1989): Cardiac interstitium in health and disease: The fibrillar collagen network. J Am Coll Cardiol <u>13</u>, 1637–1652
- Weber KT, Brilla CG (1991): Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and reninangiotensin-aldosterone system. Circulation <u>83</u>, 1849–1865
- Weber KT, Brilla CG (1992): Factors associated with reactive and reparative fibrosis of the myocardium. Basic Res Cardiol <u>87 Suppl 1</u>, 291–301
- Weber KT, Janicki JS, Shroff SG, Pick R, Chen RM, Bashey RI (1988): Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. Circ Res <u>62</u>, 757–765
- Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL, Schübeler D (2005): Chromosomewide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. Nat Genet <u>37</u>, 853–862
- Weinberg EO, Schoen FJ, George D, Kagaya Y, Douglas PS, Litwin SE, Schunkert H, Benedict CR, Lorell BH (1994): Angiotensin-converting enzyme inhibition prolongs survival and modifies the transition to heart failure in rats with pressure overload hypertrophy due to ascending aortic stenosis. Circulation <u>90</u>, 1410–1422
- Westermann D, Kasner M, Steendijk P, Spillmann F, Riad A, Weitmann K, Hoffmann W, Poller W, Pauschinger M, Schultheiss H-P, Tschöpe C (2008): Role of left ventricular stiffness in heart failure with normal ejection fraction. Circulation <u>117</u>, 2051–2060
- Wilkinson EL, Backman H, Hecht HH (1952): Cardiovascular and renal adjustments to a hypotensive agent. J Clin Invest <u>31</u>, 872–879
- Wuytack F, Raeymaekers L, Missiaen L (2002): Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. Cell Calcium <u>32</u>, 279–305

- Xu X, Tan X, Tampe B, Nyamsuren G, Liu X, Maier LS, Sossalla S, Kalluri R, Zeisberg M,
 Hasenfuss G, Zeisberg EM (2015): Epigenetic balance of aberrant Rasal1 promoter
 methylation and hydroxymethylation regulates cardiac fibrosis. Cardiovasc Res <u>105</u>, 279–291
- Xu X, Tan X, Tampe B, Wilhelmi T, Hulshoff MS, Saito S, Moser T, Kalluri R, Hasenfuss G, Zeisberg EM, Zeisberg M (2018): High-fidelity CRISPR/Cas9- based gene-specific hydroxymethylation rescues gene expression and attenuates renal fibrosis. Nat Commun <u>9</u>, 3509
- Yamamoto K, Masuyama T, Sakata Y, Mano T, Nishikawa N, Kondo H, Akehi N, Kuzuya T, Miwa T, Hori M (2000): Roles of renin-angiotensin and endothelin systems in development of diastolic heart failure in hypertensive hearts. Cardiovasc Res <u>47</u>, 274–283
- Yu L-M, Xu Y (2015): Epigenetic regulation in cardiac fibrosis. World J Cardiol 7, 784-791
- Zeisberg EM, Zeisberg M (2013): The role of promoter hypermethylation in fibroblast activation and fibrogenesis. J Pathol <u>229</u>, 264–273
- Zeisberg EM, Zeisberg M (2016): A Rationale for Epigenetic Repurposing of Hydralazine in Chronic Heart and Kidney Failure. J Clin Epigenetics <u>2</u>
- Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, et al. (2007): Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. Nat Med <u>13</u>, 952–961
- Zeisberg M, Neilson EG (2010): Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. J Am Soc Nephrol <u>21</u>, 1819–1834
- Zeisberg M, Kalluri R (2013): Cellular Mechanisms of Tissue Fibrosis. 1. Common and organspecific mechanisms associated with tissue fibrosis. Am J Physiol Cell Physiol <u>304</u>, C216–C225
- Zeisberg M, Zeisberg EM (2015): Precision renal medicine: a roadmap towards targeted kidney fibrosis therapies. Fibrogenesis Tissue Repair <u>8</u>, 16
- Zeisberg M, Strutz F, Müller GA (2000): Role of fibroblast activation in inducing interstitial fibrosis. J Nephrol <u>13 Suppl 3</u>, S111-120
- Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R (2003): BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. Nat Med <u>9</u>, 964–968

Zhang Y, Huang X-R, Wei L-H, Chung AC, Yu C-M, Lan H-Y (2014): miR-29b as a Therapeutic Agent for Angiotensin II-induced Cardiac Fibrosis by Targeting TGF-β/Smad3 signaling. Mol Ther <u>22</u>, 974–985

8.2 Internetquellen

Human Protein Atlas. Tissue expression of ATP2A2.

https://www.proteinatlas.org/ENSG00000174437-ATP2A2/tissue; Zugriff und zuletzt aktualisiert am 08.10.2017

Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjöstedt E, Asplund A, et al. (2015): Tissue-based map of the human proteome. Science <u>347</u>, 1260419

Statistisches Bundesamt (Destatis) (2017): Todesursachen in Deutschland 2015.

https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todes ursachen2120400157004.html; Zugriff am 08.10.2017

WHO (2017): Fact Sheet - Cardiovascular diseases (CVDs). http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/; Zugriff am 08.10.2017

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Elisabeth Zeisberg für die Überlassung des Dissertationsthemas und ihre konstante und motivierende Betreuung. Sie ermöglichte es mir, die medizinische Wissenschaft aus theoretischer und praktischer Sicht kennenzulernen. Für Fragen war sie stets erreichbar und für Ideen offen. Ihre zuverlässige Unterstützung und anregenden Vorschläge haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. Björn Tampe möchte ich für seine unermüdliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Konzeption dieser Arbeit sowie der praktischen Umsetzung ihrer Experimente danken. Er brachte mir viele der verwendeten Methoden näher, prägte mein wissenschaftliches Denken und Arbeiten und stand mir jederzeit mit Rat und Tat zu Seite. Sein Engagement und seine Zielstrebigkeit waren mir ein Vorbild.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Gerd Hasenfuß für die Möglichkeit danken, in seiner Klinik für Kardiologie und Pneumologie promovieren zu dürfen.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Xingbo Xu für seine zuvorkommende Hilfsbereitschaft in theoretischen wie methodischen Fragen. Auch Frau Dr. Désirée Tampe danke ich für ihre Hilfestellungen in methodischer Praxis.

Schließlich möchte ich Frau Sarah Rinkleff, Frau Annika Erdmann und Frau Anika Krüger für ihre technische Assistenz und ihre Unterstützung in methodischen und organisatorischen Fragen meinen Dank aussprechen. Der gesamten Arbeitsgruppe Zeisberg verdanke ich eine zwar arbeitsreiche, jedoch sehr interessante, anregende und gewinnbringende Zeit im Labor.