

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin,
Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie

Institutsdirektor: Prof. Dr. Thomas Eschenhagen

Etablierung eines Modells zur Charakterisierung epigenetischer Aspekte der kardialen Hypertrophie im künstlichen Herzgewebe

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Lena Marie Bartholdt
aus Hannover

Hamburg 2018

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.03.2019

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Thomas Eschenhagen

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Viacheslav Nikolaev

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Herzinsuffizienz	1
1.1.1	Therapie der Herzinsuffizienz	3
1.2	Epigenetik	5
1.2.1	DNA-Methylierung	6
1.2.2	Histon-Modifikation	9
1.3	Epigenetik und Herzinsuffizienz	10
1.4	Modelle der kardialen Hypertrophie	13
1.5	Methoden zur Untersuchung der DNA-Methylierung	15
1.6	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	16
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Materialien	17
2.2	Geräte	18
2.3	Chemikalien und Lösungen	19
2.4	Primer zur Analyse der mRNA	20
2.5	Primer zur Analyse genomischer DNA	21
2.6	Zellkultur	22
2.6.1	Isolation ventrikulärer Rattenherzzellen	22
2.6.2	Herstellung von Hühnerembryonenextrakt	22
2.6.3	Herstellung der Silikonhalterungen	23
2.6.4	Herstellung von <i>Engineered Heart Tissue</i> (EHTs) im 24-Well-Format	24
2.6.5	Mediumherstellung und Mediumwechsel-Protokoll	26
2.6.6	Interventionen zur Induktion der Hypertrophie	27
2.6.7	Interventionen zur Testung demethylierender/methylierender Substanzen	28
2.6.8	Videooptische Messung funktioneller Parameter	28
2.6.9	Ernte der EHTs	30
2.6.10	Ermittlung des Glukoseverbrauchs	30
2.7	Molekularbiologische Methoden	31
2.7.1	RNA/DNA-Isolation	31
2.7.1.1	RNA-Isolation	31
2.7.1.2	DNA-Isolation	32
2.7.2	RNA-Analysen	32
2.7.2.1	Reverse Transkription	32

2.7.2.2	Quantitative Echtzeit-PCR (RT-qPCR) zur Bestimmung der mRNA-Konzentration	33
2.7.3	DNA-Analysen	35
2.7.3.1	Mechanische Fragmentierung der genomischen DNA	35
2.7.3.2	Anreicherung methylierter DNA mittels <i>MethylCap</i> -Kit	35
2.7.3.3	Anreicherung methylierter DNA mittels <i>MethylCollector Ultra</i> -Kit	36
2.7.3.4	Aufreinigung der DNA	37
2.7.3.5	PCR zur Quantifizierung der methylierten genomischen DNA	38
2.7.3.6	Primerdesign	40
2.7.3.7	Gelelektrophorese	40
2.7.3.8	NimbleGen Whole Genome Methylation Chip	41
2.8	Statistische Methoden	42
3	ERGEBNISSE	43
3.1	Optimierung des Zellkulturmediums	44
3.1.1	Trijodthyronin-Konzentrationen in Aliquots	44
3.1.2	Hydrokortisonsupplementierung im serumfreien Zellkulturmedium	45
3.2	Hypertrophie-Intervention und Qualitätskontrolle	47
3.2.1	Vergleich verschiedener Methoden zur Bestimmung der Glukosekonzentration im Medium	47
3.2.2	Kontraktilität und Glukoseverbrauch	48
3.3	Methodenetablierung Pulldown-Protokoll zur DNA-Methylierungsanalyse	52
3.3.1	Etablierung der DNA- und RNA-Extraktionsmethoden	52
3.3.2	Primer-Optimierung zur Methylierungsanalyse	54
3.4	Trankriptionsanalyse und Einzelpromotormethylierung nach Pulldown-Protokoll mit <i>MethylCollector Ultra</i> (Active Motif)	57
3.4.1	Expressionsanalyse	57
3.4.2	Quantifizierung methylierter DNA nach Anreicherung mittels <i>MethylCollector Ultra</i>	57
3.5	Trankriptionsanalyse und Einzelpromotormethylierung nach Pulldown-Protokoll mit <i>MethylCap-Kit</i> (Diagenode)	59
3.5.1	Expressionsanalyse	59
3.5.2	Quantifizierung methylierter DNA nach Anreicherung mittels <i>MethylCap-Kit</i>	60
3.6	Pulldown mittels <i>MethylCap-Kit</i> für NimbleGen Whole Genome Methylation Array ...	62
3.6.1	Validierung der Methoden	62
3.6.1.1	Expressionsanalyse	62
3.6.1.2	Photometrische Qualitätskontrolle der isolierten genomischen DNA	63
3.6.2	Pulldown und qPCR-Analyse des Methylierungsgrades einzelner	

Promotorbereiche.....	64
3.6.3 Einzelpromotorplots der NimbleGen Whole Genome Methylation Array-Analyse...	65
3.6.4 Clusteranalyse.....	75
3.7 Erste Versuche der Beeinflussung mittels methylierender und demethylierender Substanzen.....	77
3.7.1 Videooptische Bestimmung funktioneller Parameter	77
3.7.2 Expressionsanalysen.....	78
4 DISKUSSION	80
4.1 Das <i>in vitro</i> -Modell der kardialen Hypertrophie ist zur Untersuchung epigenetischer Mechanismen geeignet.....	80
4.2 Methodische Herausforderungen in der Etablierung des Pulldown-Assays	82
4.3 Hypertrophe Stimuli führen zu einer differenziellen Methylierung in Kardiomyozyten, welche teilweise mit der Genexpression korreliert.....	84
4.4 Erste Versuche zum Einfluss verschiedener (potentieller) DNA- Methyltransferaseinhibitoren auf Kontraktionsverhalten und Gen-Transkription in EHTs	89
4.5 Ausblick.....	93
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	94
6 SUMMARY	96
7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	98
8 LITERATURVERZEICHNIS.....	101
9 VERÖFFENTLICHUNGEN	105
10 DANKSAGUNG.....	106
11 LEBENSLAUF.....	107
12 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	108

1 EINLEITUNG

Ziel der Arbeit war es, anhand eines *in vitro*-Modells epigenetische Merkmale, speziell die DNA-Methylierung, in kardialen Gewebe nach Induktion einer pathologischen Hypertrophie durch mechanische, beziehungsweise medikamentöse Stimulation, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen zu beschreiben. Hierzu erfolgten RNA-Analysen für ausgewählte Gene des sogenannten fetalen Genprogrammes, sowie DNA-Untersuchungen mittels Einzelpromotoruntersuchung in der quantitativen PCR und eines genomweiten Methylierungs-Arrays. Grundgedanke war es, basale Kenntnisse über die Rolle der Epigenetik in der Pathogenese der kardialen Hypertrophie als wesentlichen Risikofaktor für die Entstehung der Herzinsuffizienz zu gewinnen, und somit in der Zukunft einen möglichen Ansatzpunkt medikamentöser Therapien zu identifizieren.

1.1 Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist laut statistischem Bundesamt mit 47.414 Sterbefällen (5,1% der Sterbefälle), nach der chronisch ischämischen Herzerkrankung und dem akuten Myokardinfarkt, die dritthäufigste Todesursache in Deutschland (Bundesamt für Statistik, Sterbefälle insgesamt im Jahr 2015 nach ICD 10-Kodierung). Insgesamt stellte die Gruppe der Herz-Kreislaufkrankungen mit 356 616 Sterbefällen (circa 39% der Sterbefälle) die Haupttodesursache im Jahr 2015 dar. Viele der unter dem Begriff der „Herz-Kreislaufkrankungen“ zusammengefassten Krankheitsbilder, wie die chronisch ischämische, oder die hypertensive Herzkrankheit teilen als gemeinsame Endstrecke das klinische Bild der Herzinsuffizienz. Im Jahr 2006 war die chronische Herzinsuffizienz in Deutschland erstmals die häufigste Hauptdiagnose bei den krankheitsassoziierten stationären Krankenhausaufenthalten und verursachte Krankheitskosten von rund 2,9 Milliarden Euro (Neumann et al. 2009). Aufgrund des demografischen Wandels mit zunehmender Alterung der Gesellschaft und bei besserer medizinischer Versorgung mit abnehmender Letalität von Akutereignissen, wie Beispielsweise dem Myokardinfarkt, ist für die Zukunft mit einer weiter steigenden Prävalenz für die chronische Herzinsuffizienz in Deutschland zu rechnen.

Die Herzinsuffizienz ist ein klinisches Syndrom, welches bedingt durch einen Strukturdefekt und/oder eine Funktionsstörung des Herzens von einer verminderten Auswurfleistung, beziehungsweise erhöhten intrakardialen Drücken gekennzeichnet ist (Ponikowski et al. 2016). Bei der chronischen Herzinsuffizienz handelt es sich um ein progressives Erkrankungsbild, welchem eine Vielzahl verschiedener Erkrankungen zugrunde liegen kann. Im Rahmen der Framingham Heart Study - einer im Jahr 1948 begonnenen prospektiven

1 Einleitung

Studie zur Untersuchung der Bevölkerung der Stadt Framingham bezüglich der Prävalenz und Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen sowie ihrer Risikofaktoren - wurde die arterielle Hypertonie als bedeutsamste Ursache der Herzinsuffizienz identifiziert. Des Weiteren stellen der Myokardinfarkt, Diabetes mellitus, Klappenvitien, die linksventrikuläre Hypertrophie sowie Kardiomyopathien bedeutende Risikofaktoren zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz dar (Levy 1996). Kardiale Hypertrophie ist grundsätzlich definiert als eine Größenzunahme der einzelnen Kardiomyozyten, unabhängig vom Gesamtgewicht des Herzens oder der Ventrikelmorphologie. Eine kardiale Hypertrophie kann, zusätzlich zu den oben beschriebenen Grunderkrankungen, auch physiologisches oder adaptives Resultat einer vermehrten Belastung im Rahmen eines herzkreislaufwirksamen Trainings, wie beispielsweise bei Radfahrern oder Ruderern, sein. Die Begriffe der physiologischen/pathologischen, beziehungsweise adaptiven/maladaptiven kardialen Hypertrophie werden in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert (Dorn et al. 2003). Die pathologische Hypertrophie von Kardiomyozyten geht, im Gegensatz zur oben erwähnten physiologischen Hypertrophie, typischerweise mit der erhöhten Expression bestimmter Gene eines so genannten fetalen oder hypertrophen Genprogramms einher, welches dem Expressionsmuster während der embryonalen Entwicklung ähnelt. Zu diesem fetalen Genprogramm zählen das atriale natriuretische Peptid (ANP; NPPA), das natriuretische Peptid Typ B (BNP, NPPB), die β -Isoform der schweren Myosinkette (β -MHC, MYH7), α -skelettales Aktin (ACTA1) sowie die Kalzium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA2a, ATP2a2; Dorn et al. 2003).

Nach Exposition gegenüber einem Stimulus, wie beispielsweise der Nachlasterhöhung, stehen dem Herzen zunächst verschiedene Kompensationsmechanismen zur Verfügung. Diese beinhalten die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und des adrenergen Nervensystems, sowie die Sekretion des antidiuretischen Hormons (ADH) zur Retention von Salz und Wasser und damit einhergehend eine zunächst verstärkte myokardiale Kontraktilität zum Erhalt der kardialen Auswurfleistung. Gleichzeitig werden vermehrt ausgleichende vasodilatierende Moleküle, wie das atriale natriuretische Peptid, das natriuretische Peptid Typ B, Prostaglandine (PGE₂ und PGI₂) und Stickoxid (NO), aktiviert. Die Aktivierung der neurohumoralen Kompensationsmechanismen führt initial zu einer Verbesserung der Pumpfunktion des Herzens, im weiteren Verlauf überwiegen jedoch vasokonstriktorische und Volumen-retinierende Effekte mit sukzessiver Verschlechterung der Herzauswurfleistung. Bei Erschöpfung der Kompensationsmechanismen kommt es zu einem Rückstau des Blutes zum Herzen mit klinischen Symptomen wie (nächtliche) Dyspnoe, verminderte Belastbarkeit, Ödembildung und Nykturie sowie Zeichen einer stauungsgeschädigten Leber oder Niere. Die Herzinsuffizienz geht letztlich mit einer Vielzahl

1 Einleitung

struktureller und funktioneller Veränderungen des Myokards einher. Zu diesen Veränderungen gehören zunächst die myozytäre Hypertrophie, im Verlauf folgen die Desorganisation der Sarkomere, Veränderungen im Kalzium-*Handling*, die Veränderung kontraktile Eigenschaften der Kardiomyozyten, ein progressiver Verlust von Myozyten durch Nekrose und Apoptose mit konsekutiver Fibrose, eine β -adrenerge Desensitivierung, eine Umstellung des Zellstoffwechsels hin zur anaeroben Glykolyse, sowie eine Reorganisation der extrazellulären Matrix (Hill and Olson 2008). Für die Homöostase der Extrazellulärmatrix sind im Wesentlichen die kardialen Fibroblasten verantwortlich. Im gesunden Herzgewebe spielen sie als große Zellpopulation neben den Kardiomyozyten eine wesentliche Rolle für den Erhalt der Gewebestruktur und für mechanische, biochemische und auch elektrische Eigenschaften des Herzens. Durch die oben genannten Veränderungen kommt es letztlich zu einer Vermehrung und veränderten Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (Fibrosierung), was sich auf vielen Ebenen negativ auf die Funktion des Gewebes auswirken kann (Zeisberg and Kalluri 2010).

1.1.1 Therapie der Herzinsuffizienz

Das Behandlungsziel der Herzinsuffizienztherapie besteht im Wesentlichen in einer Verbesserung des funktionellen Status des Herzens und damit einhergehend einer Symptommindering und Verbesserung der Lebensqualität für den Patienten. Des Weiteren soll ein Fortschreiten der Erkrankung verlangsamt werden. Die Therapie der manifesten Herzinsuffizienz besteht zunächst aus nichtmedikamentösen Maßnahmen, wie der Normalisierung des Körpergewichts, regelmäßiger körperlicher Bewegung sowie Limitierung der Flüssigkeitszufuhr bei Hypervolämie. Hinzu kommt die Reduktion anderer kardiovaskulärer Risikofaktoren, beispielsweise durch optimale Einstellung eines Diabetes mellitus oder einer arteriellen Hypertonie. Bei schwerer Herzinsuffizienz kann auch eine Begrenzung der Kochsalzzufuhr zur Vermeidung einer Volumenbelastung sinnvoll sein. Häufig sind diese Maßnahmen - auch aufgrund mangelnder Adhärenz des Patienten - nur schwer umsetzbar; eine umso größere Rolle kommt deshalb der medikamentösen Therapie zu. Die Angiotensin-Converting-Enzym- (ACE-) Hemmer stellen gemeinsam mit den β -Rezeptor-Antagonisten die wesentliche Grundlage der medikamentösen Therapie dar. Zum einen senken sie Vor- und Nachlast des Herzens, zum anderen durchbrechen sie den durch die neurohumorale Aktivierung geschaffenen *Circulus vitiosus* und wirken sich prognoseverbessernd aus. Stadien-adaptiert erfolgt die zusätzliche Gabe von Mineralokortikoidrezeptorantagonisten (MRA), welche ebenfalls prognoseverbessernd wirken. In einigen Fällen kann die Medikation mit Ivabradin und Herzglykosiden (Digitalis) zusätzlich indiziert sein. Diuretika senken bei Hypervolämie zusätzlich die Symptomlast (Ponikowski et al. 2016). In den aktuellen Leitlinien zur Therapie der Herzinsuffizienz kann

1 Einleitung

zudem bei Patienten mit hochgradig reduzierter Pumpfunktion und klinischer Symptomatik, trotz optimaler medikamentöser Herzinsuffizienztherapie in maximal möglicher Dosierung, die Medikation mit dem Angiotensinrezeptor/Neprilysin-Hemmer Sacubitril/Valsartan (Entresto) erwogen werden. Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz können zusätzlich von der Implantation eines Defibrillators und/oder eines Schrittmachersystems profitieren. Durch eine zunehmende intraventrikuläre Leitungsstörung und eine dadurch bedingte asynchrone Kontraktion der Ventrikel wird die Pumpfunktion zusätzlich vermindert. In diesem Fall kann in bestimmten Fällen durch die Implantation eines 3-Kammer-schrittmachers eine Resynchronisation der Kontraktion von linkem und rechtem Ventrikel und somit eine verbesserte Auswurfleistung des Herzens erreicht werden. Die *Ultima Ratio* stellt bei therapierefraktärer Herzinsuffizienz die Herztransplantation dar, wobei die Verfügbarkeit geeigneter Organe ausgesprochen gering ist und Patienten somit häufig vor Erhalt eines Spenderorgans versterben.

1 Einleitung

1.2 Epigenetik

Der Begriff „Epigenetik“ umfasst eine ausgesprochen heterogene Gruppe eng miteinander vernetzter Mechanismen, welche durch Veränderungen der Chromatinstruktur zu einer Transkriptionsregulation führen, ohne dabei die zugrundeliegende DNA-Sequenz zu verändern. Erstmals definiert wurde der Begriff Epigenetik 1940 durch Conrad Waddington als „*the causal interactions between genes and their products, which bring the phenotype into being*“. Erst wesentlich später wurde 1975 die DNA-Methylierung als erster epigenetischer Mechanismus durch Arthur Riggs, sowie Robin Holliday und John Pugh identifiziert (Ordovás and Smith 2010). Neben der DNA-Methylierung stellen die Histon-Modifikationen sowie verschiedene Regulationsmechanismen durch nicht Protein-codierende RNA-Spezies (lncRNA, miRNA, etc.) als regulatives Element auf posttranskriptioneller Ebene wesentliche epigenetische Mechanismen dar.

Zum einen gelten epigenetische Mechanismen als stabiles Merkmal, das sogar über Generationen weitergegeben werden kann. Auf diese Weise können beispielsweise zwei genetisch identische Mäuse, deren DNA im *agouti*-Locus - einem Gen welches die Fellfarbe beeinflusst – unterschiedlich methyliert ist, Nachwuchs mit unterschiedlichen Fellfarben zeugen (Bird 2007). Zum anderen unterliegen epigenetische Mechanismen einer starken Dynamik und geben dem Organismus somit die Möglichkeit, auf äußere Einflüsse zu reagieren (Métivier et al. 2008). Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass Umwelteinflüsse wie Ernährung, Rauchen oder Luftverschmutzung einen direkten Effekt auf die Epigenetik und somit auch auf den gesamten Organismus haben können. Beispielsweise untersuchten Heijmans et al. (2008) Personen, welche während des *Dutch Hunger Winters* 1944-1945 in der frühen embryonalen Phase im Leib der Mutter Mangelernährung ausgesetzt waren. Diese zeigten dann im Verlauf ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Übergewicht, Dyslipidämie und das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse. Untersucht wurden differenziell methylierte Bereiche des *insulin-like growth factor II*- (IGF2-) Gens - ein Schlüsselfaktor in menschlichem Wachstum und in der Entwicklung - welches maternellem *Imprinting* unterliegt. Es zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant verminderte Methylierung von CpGs (CpG=Cytosin-phosphatidyl-Guanin) innerhalb des Gens IGF2. Diese Hinweise, dass transiente Umwelteinflüsse in persistierenden epigenetischen Markierungen resultieren können (Heijmans et al. 2008), sind im Grunde genommen eine erste Beschreibung der möglichen Beteiligung epigenetischer Mechanismen in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen.

1 Einleitung

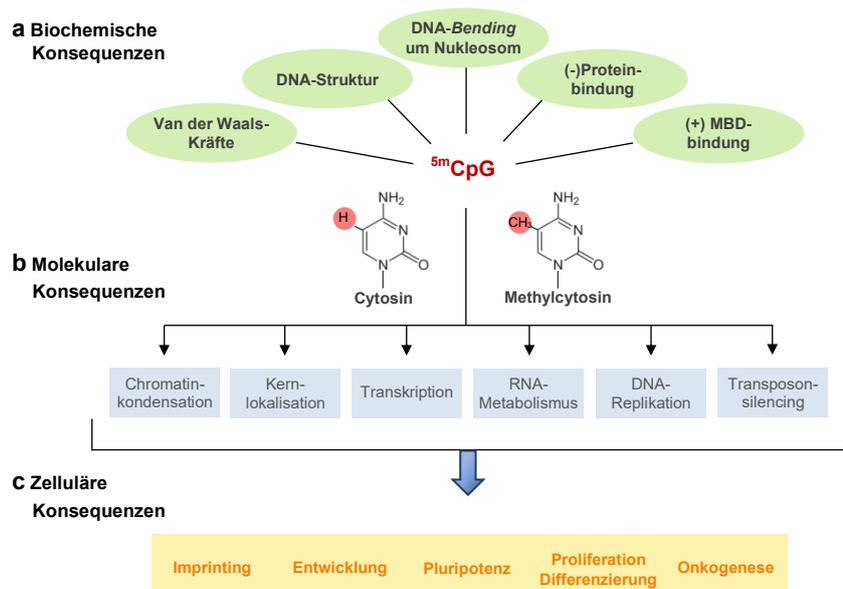


Abb. 1.1: DNA-Methylierung. Schematische Darstellung biochemischer, molekularer und zellulärer Konsequenzen. Grafik nach Franchini et al. 2012.

1.2.1 DNA-Methylierung

Der Mechanismus der DNA-Methylierung ist, zumindest auf chemischer Ebene, das wahrscheinlich am besten verstandene epigenetische Phänomen, wenn auch die funktionelle Rolle der DNA-Methylierung im Gesamtkonzept der Epigenetik und im Zusammenspiel mit anderen Mechanismen, sowie ihre Funktion in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankung in weiten Teilen wenig erforscht und kaum verstanden ist (Papait and Condorelli 2010).

Unter DNA-Methylierung versteht man die kovalente Bindung einer Methylgruppe an die 5'-Position eines Cytosinringes innerhalb der Sequenz 5'-CG-3', auch als CpG-Dinukleotid bezeichnet. Die CpG-Dinukleotide finden sich im menschlichen Genom hauptsächlich innerhalb von Regionen mit langen, repetitiven Sequenzen, wie beispielsweise in Centromeren, Telomeren, oder innerhalb von so genannten CpG-Inseln. In Säugetieren befinden sich circa 70-80% der CpG-Dinukleotide in einem methyliertem Zustand, wobei sich demethylierte CpGs zumeist in *Clustern* innerhalb des Promotors in der 5'-Region eines Gens finden und Teil der Transkriptionsinitiation sind. Diese CpG-reichen Elemente innerhalb der DNA-Sequenz nennen sich CpG-Inseln und sind im Allgemeinen definiert mit einer Länge von mindestens 200 Basenpaaren mit einem GC-Gehalt von >50% (Illingworth et al. 2010).

1 Einleitung

Die „*ratio of observed to expected CpG*“ ist in der Regel größer als 0,6 und wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Observed/Expected CpG} = \text{Anzahl der CpG} * N / (\text{Anzahl der C} * \text{Anzahl der G})$$

Wobei N die Länge der Sequenz ist.

Bei der Cytosinmethylierung handelt es sich um einen aktiven Prozess, welcher durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysiert wird. Es werden drei aktive DNA-Methyltransferasen unterschieden: DNMT1, DNMT3a und DNMT3b, wobei die DNMT1 im Wesentlichen der Aufrechterhaltung des Methylierungsstatus hemimethylierter DNA bei der DNA-Replikation dient. Die DNMT3a und 3b dienen vorwiegend der *de novo*-Methylierung in der frühen Embryogenese (Borgel et al. 2010). Als Methyl-Donor dient jeweils S-Adenosyl-L-Methionin (SAM). Bei der DNMT2 handelt es sich tatsächlich um eine tRNA-Methyltransferase, sodass sie folglich in TRDMT2 umbenannt wurde (Stenzig and Foo 2016). Der Prozess der DNA-Demethylierung ist ausgesprochen komplex, und die involvierten Mechanismen und ihre Vernetzung sind nicht abschließend aufgedeckt. Insgesamt hat die Forschung in den letzten Jahren jedoch die Vorstellung gestärkt, dass es sich sowohl bei der genomweiten, als auch bei der spezifischen DNA-Demethylierung auch um einen aktiven, replikationsunabhängigen Prozess handeln kann (Métivier et al. 2008; Schmitz et al. 2009). Aktuelle Forschungsergebnisse unterstützen die Idee, dass 5-Methylcytosinbasen katalysiert durch Enzyme der *Ten-Eleven Translocation*-Oxygenasen (Tet1-3) in mehreren Oxidationsschritten in die Zwischenprodukte 5-Hydroxymethylcytosin, 5-Formylcytosin und 5-Carboxylcytosin umgewandelt werden können. Anschließend können diese durch *Base Excision Repair* (BER) oder replikationsabhängig durch Verdünnung in Cytosin umgewandelt werden. Letzteres scheint für den Großteil des genomweiten Verlustes an 5-Methylcytosin während der frühen Entwicklung verantwortlich zu sein, während *Short-* und *Longpatch*-BER vor allem in die genspezifische Demethylierung involviert zu sein scheint. Ein weiterer Mechanismus der aktiven spezifischen Demethylierung ist beschrieben worden, bei dem Methylcytosin zunächst zu Thymin deaminiert wird. Der daraus resultierende *T/G-mismatch* kann anschließend durch eine Thymin-spezifische DNA-Glykosylase (*Thymine Dependent Glycosylase*, TDG) via BER prozessiert werden. Das *Growth Arrest and DNA Damage Inducible Protein 45 a* (Gadd45a) scheint durch Interaktion mit TDG zur Cytosin-Demethylierung beizutragen. Eine neuere Studie identifizierte das Protein *Inhibitor of Growth 1* (Ing1) als Bindeglied zwischen dem Histon H3K4me3 - einem Marker aktiven Chromatins - und Gadd45a, wodurch eine mögliche Spezifität der Demethylierung zu erklären wäre (Franchini et al. 2012; Schomacher 2013).

Die Methylierung von Cytosinbasen innerhalb des Gens ist möglicherweise mit einer erhöhten Transkription vergesellschaftet, während die Methylierung eines Cytosins innerhalb

1 Einleitung

einer CpG-Insel im Bereich des Promoters eines Gens mit einer verminderten Transkription einher geht. Hier führt eine vermehrte DNA-Methylierung durch eine Blockade der Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren an *Cis-DNA Binding Elements* in der Regel zu einer verminderten Expression des betroffenen Gens. Zusätzlich stellen die methylierten CpG-Elemente eine Bindungsstelle für Methyl-CpG-bindende Proteine (*Methylated DNA-Binding Proteins*; kurz MBDs) wie beispielsweise MeCP2 und MBD1-4 dar. Diese Gruppe von Proteinen zeichnet sich durch ihre Bindungsaffinität für methylierte Cytosine innerhalb der DNA aus. Eine Ausnahme hiervon ist das *Methyl-CpG Binding Domain Protein 3* (MBD3). Es unterscheidet sich vom MBD2 lediglich in zwei Aminosäure-Resten innerhalb der methylbindenden Domäne, verliert dadurch jedoch die Fähigkeit, Methylgruppen zu erkennen (Fraga 2003). Es ist Teil des *Nucleosome Remodelling and Histone Deacetylation* (NuRD) Corepressor-Komplexes. Dieser bildet gemeinsam mit dem MBD2 das *Methyl-CpG Binding Protein1* (MeCP1), den ersten Proteinkomplex mit nachgewiesener Methyl-CpG-bindender Aktivität und Methylierungsdichte-abhängiger Transkriptionsrepression. Für das MBD1 konnte im Gegensatz zu anderen methylbindenden Proteinen in Transfektionsmodellen die Transkriptionsrepression sowohl methylierter als auch unmethylierter Promotoren gezeigt werden. Das Protein beinhaltet Kopien cysteinreicher Motive, welche unter anderem auch in der DNMT1 und der Histonmethyltransferase MLL zu finden sind. Seine starke Transkriptionsrepressions-Aktivität liegt wahrscheinlich in der Fähigkeit begründet, transkriptionsreprimierende Histondeacetylasen (HDACs, siehe auch unten) zu rekrutieren. MBD4 ist das einzige MBD-Protein, welches nicht in die Transkriptionsrepression involviert zu sein scheint. Im Gegensatz zu anderen MBD-Proteinen besitzt es eine Glykosylasedomäne, welche in Kombination mit der hohen Bindungsaffinität für Methylcytosine innerhalb von *5mCpG/ThpG-Mismatches* in der Lage ist, Thymin-Nukleoside herauszuschneiden und dadurch möglicherweise eine Mutabilität zu verringern (siehe aktive Demethylierung). Das MeCP2 wurde als zweites Protein mit methylbindender Eigenschaft beschrieben. An ihm wurde die methylbindende Domäne definiert (Nan et al. 1993) und erstmals die molekulare Verbindung zwischen DNA-Methylierung und Histonmodifikation erforscht. Es besitzt eine hohe Affinität für methylierte DNA, seine Bedeutung ist jedoch nicht abschließend geklärt (Hendrich and Tweedie 2003; Klose and Bird 2006). So ist die DNA-Methylierung in der Lage, durch Interaktion mit MBD, Beeinflussung der Proteinbindung und der Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren, durch Veränderung der DNA- beziehungsweise Chromatinstruktur, auf die Transkription und somit diverse Zellfunktionen Einfluss zu nehmen.

1 Einleitung

1.2.2 Histon-Modifikation

Die DNA findet sich im Zellkern in stark kondensierter Form als Chromatin verpackt. Die basale Baueinheit des Chromatins ist das Nukleosom, wobei der Nukleosomenkern aus einem Oktamer aus jeweils zwei Histonen H2A, H2B, H3 und H4 besteht, um welchen sich der DNA-Strang in 1,75 Windungen aus 146 Basenpaaren wickelt. In kondensierter Form ist die DNA der Transkription kaum zugänglich. Eine wesentliche Rolle in der Konformationsregulation der DNA spielt die Modifikation der Histone. Dieses geschieht an den amino-terminalen Enden durch Acetylierung, Methylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung oder Phosphorylierung spezifischer Aminosäurereste. Histon-Acetylierung ist ein dynamischer Prozess, welcher durch zwei Enzymfamilien katalysiert wird: Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDACs). Acetylierung von Lysinresten an den Histonen H2B, H3, H4 ist mit einer Transkriptionsaktivierung vergesellschaftet. Histon-Methylierung an Lysin und Argininresten kann in Abhängigkeit von der Lokalisation und dem Grad an Methylierung entweder aktivierend oder reprimierend auf die Transkription wirken. Katalysiert werden diese Prozesse durch Histon-Methyltransferasen (HMTs) und Histon-Demethylasen (HDMTs). Das Zusammenspiel von Histonmodifikation und DNA-Methylierungsstatus definiert den „epigenetischen Code“, welcher für die Konformation des Chromatins und somit auch für die transkriptionelle Aktivität von entscheidender Bedeutung ist (Papait and Condorelli 2010).

1.3 Epigenetik und Herzinsuffizienz

Epigenetik beeinflusst die embryonale Entwicklung, Differenzierung und die Stammzell (Re-) Programmierung und ist essentiell für normales Wachstum, Entwicklung und Zellhomöostase (Borgel et al. 2010). Epigenetische Modifikationen spielen eine essentielle Rolle in der Regulation DNA-abhängiger Prozesse wie Transkription, DNA-Reparatur und -Replikation, folglich können Veränderungen hier gravierende Folgen für den gesamten Mechanismus haben. Im Bereich der Onkologie und Hämatologie wurde in den letzten Jahren bereits intensiv die Rolle der Epigenetik in der Pathogenese verschiedener Krankheitsbilder erforscht. So konnten beispielsweise für das Myelodysplastische Syndrom (MDS) zahlreiche Signalwege identifiziert werden, welche durch aberrante DNA-Methylierung beeinflusst werden und somit einen neuen Ansatzpunkt für die Entwicklung der medikamentösen Therapie der Erkrankung darstellten. Zu den wenigen epigenetisch wirksamen Substanzen, welche bislang Eingang in die onkologische Therapie gefunden haben, gehören die hypomethylierenden Substanzen Azacitidin und Decitabin in der Therapie des MDS und mittlerweile auch anderer seltener maligner Erkrankungen (Dawson and Kouzarides 2012). Weitere Beispiele für Erkrankungen, die in Zukunft Ziel einer epigenetischen Therapie sein könnten, sind Typ 2-Diabetes, Atherosklerose, Schizophrenie und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (Csoka and Szyf 2009; Papait and Condorelli 2010).

Während in diesen Bereichen bereits vielversprechende Ansätze entwickelt worden sind, blieb die Rolle der Epigenetik in der Entstehung der Herzerkrankungen zunächst weitgehend unerforscht. Nachdem in den letzten Jahren jedoch durch verschiedene Arbeitsgruppen erstmals gezeigt werden konnte, dass die Regulierung der DNA-Methylierung auch in Herzmuskelzellen, also in differenzierten, nicht teilungsfähigen Zellen äußeren Einflüssen unterliegt und somit von Relevanz für die Pathogenese kardialer Erkrankungen ist, rückte diese in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der Forschung.

Movassagh et al. (2010) verglichen die DNA-Methylierung linker Ventrikel explantierter Herzen von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz mit gesunden Kontrollen mittels *Methylated DNA Immunoprecipitation-Array* (MeDIP-Array) sowie Bisulfitsequenzierung. Dabei konnten sie erstmals die Existenz differenzieller DNA-Methylierung im kranken Herzen nachweisen. Sie identifizierten verschiedene differenziell methylierte Gene (PECAM1, AMOTL2, ARHGAP24) und konnten eine Korrelation der DNA-Methylierung innerhalb des Gens mit der Transkriptionsrate, sowie eine inverse Korrelation der Methylierung innerhalb des Promotors mit der Transkriptionsrate des entsprechenden Gens zeigen (Movassagh et al. 2010). Auf diesen Ergebnissen aufbauend verglichen Movassagh et al. (2011) humane

1 Einleitung

linke Ventrikel mit terminaler Herzinsuffizienz mit gesunden Kontrollen bezüglich ihres Methylierungsmusters und erstellten ein genomweites Profil mit Hilfe von quantitativer Sequenzierung nach Anreicherung methylierter DNA-Fragmente durch Immunpräzipitation. Hier zeigten sich differenziell methylierte CpG-Inseln innerhalb des Promotorbereiches einzelner Gene, sowie innerhalb der Gene. Die Methylierung in Promotoren von transkriptionell hochregulierten Genen des erkrankten Herzens war signifikant reduziert, während sich in Promotoren transkriptionell herabregulierter Gene keine Veränderung im Methylierungsstatus zeigen ließ. Beispielhaft wurde eine CpG-Insel für das *Double Homeo-Box 4*-Gen (*Dux4*) näher beschrieben. Das Gen zeigte sich in insuffizienten Herzen hypermethyliert, während die Expression im Vergleich zur Kontrolle vermindert war. Im *in vitro*-Modell mit HL1-Zellen konnte durch Hinzugabe eines DNA-Methyltransferase-Inhibitors (RG 108) eine Demethylierung und konsekutiv eine vermehrte Expression des Gens gezeigt werden. Ein genomweites Mapping der Histonmodifikation H3K36me₃, welche mit aktivem Chromatin assoziiert ist, zeigte weiterhin eine auch eine Assoziation der DNA-Methylierung zu aktiv transkribierten Genbereichen (Movassagh et al. 2011). Haas et al. (2013) zeigten in einer genomweiten DNA-Methylierungsanalyse bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) ebenfalls die Existenz eines krankheitsspezifischen DNA-Methylierungsmusters. Die vier differenziell methylierten Gene LY75, ERBB3, HOXB13, ADORA2A mit bislang unbekannter Funktion in der Pathogenese der DCM wurden weiter charakterisiert. Für LY75 konnte eine negative Korrelation von CpG-Methylierung und Transkriptionsrate und für ADORA2A überraschenderweise eine positive Korrelation von Transkription und Methylierungsrate gezeigt werden, welche Haas et al. (2013) mit einer vermehrten Bindung von CCCTC-binding factor (CTCF) - welcher durch Blockade von *Enhancer*-Regionen die Transkription herunterregulieren kann - in Verbindung brachten. Für LY75 und ADORA2A konnte im *Knockout*-Modell in Zebrafischen die funktionelle Relevanz der Gene für physiologische Entwicklung und Funktion des Herzen gezeigt werden (Haas et al. 2013). Hohl et al. (2013) untersuchten erstmals Histonmodifikationen im Promotorbereich Hypertrophie-assoziiertes Gene (NPPA, NPPB) humaner Herzen und konnten einen Zusammenhang in der Regulation von HDAC 4 mit dem Methylierungsstatus von H3K9 sowie der Bindung von Heterochromatin-Protein 1 (HP1) darstellen und deren Relevanz für die Entstehung eines kardialen *Remodellings* nach akuter Erhöhung der kardialen Vorlast im *in vivo*-Modell bestätigen (Hohl et al. 2013). Gilsbach et al. (2014) stellten den zeitlichen Verlauf der DNA-Methylierung zunächst während der Reifung und dann auch der Progression einer experimentell induzierten Herzinsuffizienz in Maus-Kardiomyozyten dar. Auch hier konnten große differenziell methylierte Regionen entdeckt werden. Analog zur Reaktivierung eines fetalen Genprogramms auf Transkriptionsebene zeigte sich bei Entwicklung der Herzinsuffizienz ein charakteristisches Methylierungsmuster, welches dem

1 Einleitung

fetalen ähnelte. DNA-Demethylierung war mit aktivierenden Histonmarkierungen assoziiert und korrelierte mit einer vermehrten Genexpression. Repression demethylierter Genbereiche war mit der Histonmarkierung H3K27me3 assoziiert. Weiterhin konnte die Relevanz der DNA-Methyltransferase 3A/B für die *de novo*-Methylierung postnatal am Beispiel der *Slow Skeletal Troponin I*-Isoform (Tnni1) gezeigt werden (Gilsbach et al. 2014). Somit stellt sich die DNA-Methylierung als epigenetisches Merkmal in der kardialen Entwicklung, Reifung und in der Pathogenese der Herzinsuffizienz offenbar durchaus dynamisch und sogar reversibel dar. Diese Erkenntnis rückte die Epigenetik und speziell die DNA-Methylierung als potentiell Ziel medikamentöser Therapieansätze zunehmend in den Fokus (siehe Kapitel 3.7 und 4.4).

1.4 Modelle der kardialen Hypertrophie

Zur Untersuchung der epigenetischen Mechanismen beziehungsweise Markierungen und ihrer Rolle in der Pathogenese der myokardialen Hypertrophie stehen im Wesentlichen verschiedene Tiermodelle zur Verfügung. Das klassische Modell zur Untersuchung der kardialen Hypertrophie ist die mechanische Konstriktion der transversalen Aorta (*Transverse Aortic Constriction*, TAC), wobei durch eine operative Verengung der thorakalen oder abdominellen Aorta eine Nachlasterrhöhung erreicht wird. Des Weiteren können epigenetische Mechanismen am explantierten menschlichen Herzen untersucht werden. Hier stellen jedoch die geringe Verfügbarkeit gesunder menschlicher Herzen als Kontrollgruppe, sowie die zahlreichen Einflussgrößen, wie beispielsweise die Medikation mit verschiedenen Arzneistoffen präoperativ und die hohe Komorbidität der untersuchten Patienten, potentielle Variablen dar. So können Medikamente entweder direkt durch Alteration von DNA-Methylierung, Histonmodifikation, bzw. der Chromatinstruktur epigenetisches Wirkpotential bergen oder aber indirekt bei chronischer Exposition durch Interaktion mit Zellrezeptoren oder –proteinen und folgend veränderter Zellhomöostase adaptive epigenetische Veränderungen hervorrufen. Beispielhaft finden sich diverse Neuroleptika und Antidepressiva, aber eben auch β -Blocker, HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren (Statine) oder COX-2-Inhibitoren (Csoka and Szyf 2009).

In unserem Institut wurde ein *in vitro*-Modell zur Testung von Arzneistoffen entwickelt. Hierfür werden miniaturisierte, spontan kontrahierende, künstliche Herzgewebe (*Engineered Heart Tissue*; EHT) aus ventrikulären Herzzellen neonataler Ratten in einer Fibrin-Matrix im 24-Well-3D-Zellkulturformat kultiviert. Diese können während eines Versuches problemlos mit Hilfe eines videooptischen Messsystems wiederholt in ihrer kontraktile Funktion gemessen werden. Insgesamt zeigen zahlreiche Arbeiten, dass es mithilfe dieser Methode möglich ist, verschiedene Substanzen an miniaturisiertem Herzgewebe in hoher Stückzahl robust, reproduzierbar und mit einer verhältnismäßig geringen Anzahl an Kardiomyozyten in ihrer Wirkung zu testen (Hansen et al. 2010). Hirt et al. (2012) entwickelten auf dem Boden dieses Modells ein *in vitro*-Modell der pathologischen Myokardhypertrophie, indem sie die flexiblen Silikongerüste mithilfe von Metallklammern verstärkten, sodass die EHTs gegen einen erhöhten Widerstand arbeiten mussten. Die so erreichte Nachlasterrhöhung führte zur Hypertrophie des künstlichen Herzgewebes mit charakteristischen funktionellen, histologischen und molekularbiologischen Veränderungen. Das entwickelte Modell der pathologischen Myokardhypertrophie bietet die Möglichkeit, den Mechanismus der Nachlast-induzierten Herzinsuffizienz weitgehend befreit von äußeren Einflüssen zu studieren. Diese Möglichkeit ist durch die rein mechanische Belastung bei fehlenden zusätzlichen Einflüssen wie Substanzen mit unbekannter Wirkung auf den Grad der Hypertrophie und möglicher

1 Einleitung

epigenetischer Wirkung insbesondere für die Untersuchung epigenetischer Mechanismen von Vorteil. Des Weiteren bietet das Modell die von Hansen et al. (2010) beschriebenen Vorteile zur Untersuchung auch bei potentiell epigenetisch wirksamen Substanzen und somit die idealen Voraussetzungen für die Identifizierung neuer Angriffspunkte in der Therapie der pathologischen Hypertrophie und damit zur Vermeidung der Entwicklung einer symptomatischen Herzinsuffizienz.

1.5 Methoden zur Untersuchung der DNA-Methylierung

Zur Analyse des Methylierungszustands von DNA gibt es verschiedene Ansätze und Herangehensweisen, von denen einige dazu dienen, die Methylierung längerer Sequenzen abzuschätzen, während andere der Analyse mit Einzelbasenpaar-Auflösung dienen. Methoden zur Abschätzung des Methylierungsgrades ganzer Sequenzen, im Gegensatz zu einzelnen Cytosinbasen, bedienen sich oft der Verwendung von Antikörpern, welche an methylierte DNA binden (z.B. *Methylated DNA immunoprecipitation*; MeDIP). Das Prinzip der MeDIP wurde erstmals durch Weber et al. (2005) beschrieben. Sie verwendeten einen spezifischen monoklonalen Antikörper gegen 5-Methylcytosine, mit welchem fragmentierte DNA inkubiert wurde. Anschließend wurde die Ziel-DNA an magnetische Nanopartikel (Dynabeads) mit einer Antikörperdomäne gegen Maus-IgG gebunden und so angereichert. Danach erfolgte die Extraktion mittels Phenol-Chloroform, gefolgt von einer Ethanol-Präzipitation (Weber et al. 2005). Die Methode kann mit verschiedenen Arrays zur DNA-Quantifizierung, beziehungsweise zur genomweiten Methylierungsanalyse kombiniert werden. Eine weitere Methode zur Analyse methylierter DNA bedient sich methylierungsspezifisch schneidender Restriktionsendonukleasen. Gängige methylierungs-spezifische Restriktionsendonukleasen sind +MspI (schneidet methylierte DNA) und +HpaII (schneidet lediglich unmethylierte DNA), welche in Kombination zur Identifizierung methylierter Cytosine verwendet werden können. Nach Glykosylierung von Hydroxy-Methylcytosin erfolgt hierbei der Verdau jeweils mit +MspI und +HpaII, anschließend können die Produkte mittels PCR amplifiziert und quantifiziert werden. Zur Aufklärung der DNA-Methylierung mit Einzel-CpG-Auflösung kommt oft die mit Natriumbisulfitbehandlung kombinierte Sequenzierung zum Einsatz. Das Prinzip der Bisulfitreaktion beruht darauf, dass unmethylierte Cytosine unter der Behandlung mit Bisulfit zu Uracil deaminiert werden, welches anschließend in einer der Sequenzierung vorangestellten PCR als Thymin amplifiziert wird. Anschließend kann durch quantitative Sequenzierung der DNA und Vergleich mit einer Referenzsequenz der Methylierungsgrad jeder Cytosinbase als Verhältnis der Anzahl der Sequenzier-*Reads* als C (methyliert), bzw. T (unmethyliert) dargestellt werden. Eine weitere Gruppe der Methoden nutzt das selektive Bindungsverhalten von Proteinen mit methylbindender Domäne an methylierte DNA, nicht aber an unmethylierte DNA (MBD; siehe Kapitel Einleitung DNA-Methylierung). Ein Beispiel hierfür ist der *Methylated Island Recovery Assay* (MIRA), welcher sich der hohen Affinität des Proteinkomplexes MBD2/MBD3L1 für methylierte DNA bedient. Das Protein bindet sequenzunabhängig an methylierte doppelsträngige DNA. Es sind also keine spezifischen Erkennungssequenzen innerhalb der untersuchten Sequenz, sowie kein Antikörper notwendig, wodurch eine relativ hohe Spezifität und Sensitivität bedingt werden. Diese Methode kann dann mit verschiedenen Assays, wie beispielsweise der quantitativen

1 Einleitung

Sequenzierung (MIRA-Seq), der *Array*-Hybridisierung (MIRA-Array) oder qPCR, zur weiteren Analyse kombiniert werden (Rauch and Pfeifer 2010). Die beiden letzten Methoden sollten in dieser Arbeit zum Einsatz kommen. Das von uns verwendete *MethylCollector Ultra*-Kit bedient der Verwendung eines MBD2/MBD3L-Fusionsproteins und wurde in dieser Arbeit zur Analyse kleinster Gewebemengen optimiert. Am Ende sollte die Möglichkeit bestehen, die Vorzüge des etablierten *in vitro*-Modells der kardialen Hypertrophie mit einer möglichst sensitiven, spezifischen und kostengünstigen Methode zur Analyse von Methylierungszuständen in kleinsten Gewebemengen zu vereinen. Auch das später verwendete *MethylCap*-Kit basiert auf den Bindungseigenschaften eines MBD-Proteins, in diesem Fall dem MeCP2-Protein.

1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es,

1. eine Methode zur Analyse des Methylierungsstatus einzelner Promotoren zu etablieren,
2. die Eignung des *in vitro*-Modells der kardialen Hypertrophie zur Untersuchung epigenetischer Markierungen zu testen,
3. charakteristische Methylierungsmuster im *in vitro*-Modell mit Hilfe einer Microarray-Analyse zu reproduzieren und
4. die Frage nach der zeitlichen Plastizität dieser Prozesse zu beantworten.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

Bezeichnung	Firma
Silikonschlauch ID x AD: 0,5 x 1,3 mm	Fisher Scientific
Spritzenfilter Filtropur S 0,2	Sarstedt
GAC Nubryte Stangendraht Typ 304 VAR Größe .016", Länge 14"	Dentsply Sirona
SYLGARD 184 Elastomer-Kit	Dow Corning
Injektionskanüle BD eclipse, 20 G 1 TW	BD
Polytetrafluorethylen (PTFE; Teflon)	
24-Well-Zellkulturschale	Nunc
Serologische Pipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Pipettenspitzen <i>Biosphere Filtertips</i>	Sarstedt
Cellstar <i>Tubes</i> 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one
Omnifix-F, Feindosierungsspritzen 1 ml	Braun
Edelstahlkugeln <i>Tissuelyser</i>	Qiagen
Neubauer Zählkammer (oder verbesserte Neubauer - Zählkammer)	Biochrom
<i>High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i>	Applied Biosystems
<i>NucleoSpin TriPrep</i>	Macherey-Nagel
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen
<i>DNeasy Blood and Tissue Kit</i>	Qiagen
<i>MethylCap Kit</i>	Diagenode
<i>MethylCollector Ultra Kit</i>	Active Motif
<i>High Pure PCR Product Purification Kit</i>	Roche
<i>GenomePlex Complete Whole Genome Amplification (WGA)</i>	Sigma-Aldrich
Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad
384-Well <i>multiply</i> PCR-Platte	Sarstedt

2.2 Geräte

Bezeichnung	Firma
Blutgasanalysegerät, ABL90	Radiometer GmbH
Nanodrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific
qPCR-System ABI Prism 7900 HT	Applied Biosystems
Mikroskop Nikon T1SM	Nikon
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf
Zentrifuge Zellkultur Rotana/RB	Hettich
Mikrotischzentrifuge centrifuge 5414R	Eppendorf
Kühlzentrifuge centrifuge 5810R	Eppendorf
Polytron Stativ-Dispergiergerät	Kinematica
Blutzuckermessgerät Contour	Bayer
Gewebedisaggregator <i>TissueLyser</i>	Qiagen
Vortex-Mischer Vortex genie 2	Scientific Industries
PCR-Gerät, <i>Mastercycler pro S vapoprotect</i>	Eppendorf
PCR-Gerät, <i>GeneAmp PCR System 9700</i>	Applied Biosystems
Ultraschall-Disruptor Branson S-450A mit Becherresonator	Branson
Ultraschall-Disruptor Bioruptor UCD-600 NGS	Diagenode
Becherresonator	Branson
Zellinkubator MCO-K9M	Sanyo
Sterilwerkbank Mars 1200GS	Scanlaf
Videooptische Messapparatur	EHT Technologies
Wasserbad Typ 1002	GFL
Kamera Typ A602f	Basler
Kamera Achsenführung	IAI Corporation
Gelelektrophorese-Dokumentationssystem Chemigenius ² <i>Bio Imaging System</i>	Syngene
Spannungsquelle EV243	PeqLab
„Windrad“-Mischer	Conrad

2.3 Chemikalien und Lösungen

Bezeichnung	Firma
Agarose, 2% (in PBS)	Invitrogen
Aprotinin, 2 mg/ml (in <i>Aqua ad injectabilia</i>)	Sigma-Aldrich
<i>Aqua ad injectabilia</i> (bidestilliert, deionisiert, pyrogenfrei)	Baxter
Bovines Fibrinogen 200 mg/ml + 0,5 µg Aprotinin/mg Fibrinogen (0,9% NaCl)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxide DMSO	Sigma-Aldrich
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM, mit 1 g/l D-Glukose und 3,7 g/l NaHCO ₃ , ohne L-Glutamin, mit Phenolrot)	Biochrom
Endothelin-1, 10 µM (in <i>Aqua ad injectabilia</i>)	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromidlösung	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Dinatriumsalz	Roth
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Invitrogen
<i>Hanks Balanced Salt Solution</i> , HBSS	Gibco
Hühnerembryonenextrakt (CEE)	eigene Herstellung
Hydrokortison	Sigma-Aldrich
Insulin	Sigma-Aldrich
DNA-Farbstoff (6x) <i>Loading dye</i>	Fermentas
<i>Maxima SYBR Green/ ROX qPCR Master Mix</i> (2x)	Fermentas
Penicillin/Streptomycin (100x)	Gibco
Pferdeserum (PS), hitzeinaktiviert	Gibco/Life Technologies
(R)-(-)-Phenylephrinhydrochlorid	Sigma-Aldrich
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>Phosphate-buffered saline</i> , PBS)	Gibco
Proteinase K, >600 mAU/ml	Qiagen
RNAse-Inhibitor <i>RNAse OUT</i>	Fermentas
Sodium dodecyl sulfate 98%, SDS	Sigma-Aldrich
Thrombin, 100 U/ml (in PBS, <i>Aqua ad injectabilia</i>)	Sigma-Aldrich
Trijodthyronin, T ₃	European Commission-Joint Research Center
Trisaminomethan, TRIS	Roth
Trisaminomethanhydrochlorid, TRIS-HCL	Sigma
TBE Puffer (108 g Tris Base, 55 g Borsäure und 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 mit demineralisiertem Wasser auf 1 l aufgefüllt, zum Gebrauch 1:10 verdünnt)	
Trichlorethylen, TCE ≥99,5%	Sigma-Aldrich
DNA-Größenstandard 100 bp <i>DNA Ladder Gene Ruler</i>	Thermo Fisher Scientific

2.4 Primer zur Analyse der mRNA

Gensymbol	Beschreibung	RefSeq- Nummer	Primer	PPG*
Nppa	Atriales natriuretisches Peptid	NM_012612.2	For: CCTCGGAGCCTGCGAAGGTCA Rev: TGTGACACACCGCAAGGGCTTG	156
Nppb	Typ B-natriuretisches Peptid	NM_031545.1	For: GACGGGCTGAGGTTGTTTTA Rev: ACTGTGGCAAGTTTGTGCTG	195
Acta1	α -skelettales Aktin	NM_019212.2	For: AGGACCTGTACGCCAACAAAC Rev: ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	195
Myh7	β -Isoform der schweren Myosinkette (β -myosin-heavy-chain, β -MHC)	NM_017240.1	For: AGGAGGCGGAGGAACAGGCCAAC Rev: GGGCTTCACAGGCATCCTTAGGGTT	200
Atp2a2	SERCA2a	NM_001110139.2	For: GGCTCGTGGGCTCCATCTGC Rev: TCCAGTATTGCAGGCTCCAGGT	199
Col1a1	Kollagen Typ I, alpha 1	NM_053304.1	For: TGGACCTCCGGCTCCTGCTC Rev: TCGCACACAGCCGTGCCATT	172
Col3a1	Kollagen Typ III, alpha 1	NM_032085.1	For: CTGTCCC CGGAAGCACTGG Rev: ATGTTCTGGGAGGCCCGCT	178
Ctgf	<i>Connective tissue growth factor</i>	NM_022266.2	For: GCGAGCCAACTGCCTGGTCC Rev: GCGTCCGGATGCACTTTTTGCC	194
Fn1	Fibronectin 1	NM_019143.2	For: CGGTGGCATGGAGAGCCAGC Rev: TCACCCGCACTCGGTAGCCA	152
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	NM_017008.3	For: CTCATGACCACAGTCCATGC Rev: TTCAGCTCTGGGATGACCTT	155
18s	18s rRNA	V01270.1	For: ATACATGCCGACGGGCGCTG Rev: TTCGAATGGGTGTCGCCCGC	181
Gusb	Glucuronidase	NM_017015.1	For: CCCGCATGTCCCCAAGACGG Rev: CGGCACGGAAGCTCCACAGG	153

*PPG: PCR-Produkt-Größe, For=*forward*, Primer in *Sense*-Richtung, Rev=*reverse*, Primer in *Antisense*-Richtung. RefSeq=Referenzsequenznummer im Sequenzarchiv des National Center for Biotechnology Information, NCBI. Alle Primer von MWG/Eurofins.

2.5 Primer zur Analyse genomischer DNA

Gen-symbol	Beschreibung	Primer	Annealing Temp. [°C]	PPG*
Nppa	Atriales natriuretisches Peptid	For: CCCTGGGAAGGGTGGGACCA Rev: CCCCCAGACCCTCAGCTGCA	59,45	663
			60,18	
Nppb	Typ B-natriuretisches Peptid	For: CCGGGCAGGGCCTGGATTAC Rev: TGACCTCCCAGCGGCGACAG	59,20	618
			60,87	
Acta1	α -skelettales Aktin	For: GGAGGAGCGGACAGCTGGGA Rev: GTAGCCTGGCACGGTGCTGG	59,97	825
			60,04	
Oxt	Oxytocin/Neurophysin 1 Prepropeptid	For: TAGGCTGCACCTCCACCCCC Rev: CCCACGAAGCAGCCCAGCTC	59,89	737
			60,04	
Ube2b	Ubiquitin-Protein Ligase E2B	For: AAGAGCCAGGCTAGGCCGTCA Rev: CTCCTCAGGGTCACCGGGGG	59,64	711
			59,97	

2.6 Zellkultur

2.6.1 Isolation ventrikulärer Rattenherzzellen

Für die Präparation der Kardiomyozyten wurden Wistar- und Lewis-Ratten im Alter von 0-3 Tagen nach dem von der Ethik-Kommission der Universität Hamburg genehmigten Protokoll verwendet (Genehmigung ORG_516). Die Präparation erfolgte standardisiert durch die Medizinisch-Technischen Assistenten/-innen June Uebeler und Thomas Schulze. Hierbei wurden die Tiere dekapitiert und ihre Herzen unter sterilen Bedingungen entnommen. Die Atrien der neonatalen Rattenherzen wurden abgetrennt, die separierten Ventrikel zunächst mechanisch zerkleinert und anschließend einem fraktionierten Trypsin/DNAse-Aufschluss unterzogen (Eschenhagen et al., 1997). Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellkonzentration der Kardiomyozytensuspension bestimmt. Eine Zellsortierung erfolgte nicht, sodass die Zellsuspension neben den Kardiomyozyten auch weitere kardiiale Zelltypen wie Fibroblasten und Endothelzellen enthielt. Die durch dieses Verfahren gewonnenen Rattenherzzellen wurden unmittelbar für die Herstellung von *Engineered Heart Tissue* (im Folgenden EHTs) verwendet.

2.6.2 Herstellung von Hühnerembryonenextrakt

Pro Präparation wurden 120-240 bebrütete Hühnereier (7.-9. Bruttag, Versuchstierhaltung Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) benötigt. Zunächst wurden die Eier mit Ethanol (70%) benetzt und nach der Einwirkzeit mit einer Schere am stumpfen Pol eröffnet. Die Hühnerembryonen wurden mit einer Pinzette aus dem Ei entnommen, dekapitiert und in ein bis zwei 500 ml-Glasflaschen, gefüllt mit je 300 ml eisgekühltem CBFHH (*Calcium and Bicarbonate free Hanks with HEPES*; Zusammensetzung siehe Tab. 2.1) + 4% Penicillin/Streptomycin gesammelt und anschließend bei maximaler Geschwindigkeit mit einem Polytron Stativ-Dispergiergerät zerkleinert. Das Volumen wurde mit CBFHH auf 600 ml aufgefüllt und die Lösung bei 60 g für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Überstände abpipettiert, in einer Glasflasche gesammelt und auf Eis gelagert. Die Bodensätze wurden mit CBFHH resuspendiert und zusammengeführt. Es folgte eine erneute Homogenisierung mit dem Dispergiergerät sowie eine erneute Zentrifugation (60 g, 15 min, 4 °C). Die gesammelten Überstände wurden in 15 ml-Zentrifugenröhrchen abgefüllt und bei -20 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert. Alle Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Um eine Kontamination auszuschließen, wurde jeweils eine Probe des Extrakts zur mikrobiologischen Analyse in das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gegeben.

2 Material und Methoden

Tabelle 2.1: Calcium and Bicarbonate free Hanks with HEPES (CBFHH).

Chemikalie	Konzentration [g/l]	Volumen [ml]
Natriumchlorid NaCl	200	40
Kaliumchlorid KCl	40	10
Magnesiumsulfat $MgSO_4 \times 7 H_2O$	20	10
Kalium-Dihydrogenphosphat KH_2PO_4	6	10
Di-Natriumhydrogenphosphat $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$	5,97	10
Glucose	100	10
HEPES ¹	47,66	100
<i>Aqua ad injectabilia</i>		<i>ad 1000</i>

¹ HEPES in 700 ml lösen, mit 10 M NaOH auf pH 7,4 einstellen, *ad 1000* ml.

2.6.3 Herstellung der Silikonhalterungen

Für die EHTs im 24-Well-Format wurden spezielle Silikonhalterungen hergestellt. Dafür wurde das Silikonelastomer Sylgard 184 nach Herstellerangaben verwendet. Nach dem Mischen der Komponenten wurden diese zunächst unter Vakuum für 5 min gerührt, um alle Blasen aus dem Gemisch zu entfernen. Anschließend konnte das Gemisch in Polytetrafluorethylen- (PTFE; Teflon-) Formen, in welche jeweils 4 Paar Silikonschläuche eingeklemmt waren, gegossen werden. Nach 24-48 Stunden war das Silikon ausgehärtet und konnte aus den Formen herausgelöst werden. Die Silikonschläuche wurden auf eine freie Länge von je 11 mm gekürzt und die untere Öffnung des Schlauches mit einer Silikonscheibe von 2 mm Durchmesser verschlossen. So konnte zum einen das Eindringen von Zellkulturmedium in die Schläuche verhindert werden, zum anderen wurde die Adhäsionsfläche für das künstliche Herzgewebe vergrößert. Die verschlossenen Silikonschläuche werden im Weiteren als *Posts* bezeichnet. Die fertigen Silikonhalterungen wurden anschließend ausgekocht, autoklaviert und bis zum späteren Gebrauch steril verpackt gelagert.

2 Material und Methoden

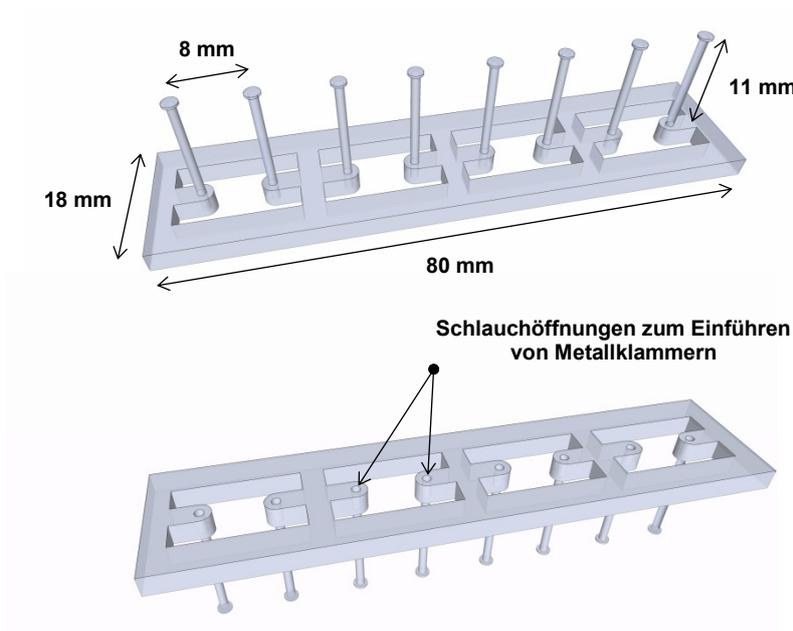


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Silikonhalterungen.

2.6.4 Herstellung von *Engineered Heart Tissue* (EHTs) im 24-Well-Format

Zur Herstellung der EHTs wurden zunächst die benötigten Agarosegussformen gefertigt. Hierzu wurden in jedes *Well* einer Zellkulturschale im 24-Well-Format 1,6 ml 60 °C warme, flüssige, zweiprozentige Agarose (in PBS gelöst) eingebracht. Anschließend wurden die eigens angefertigten Platzhalter aus PTFE zügig in der Zellkulturschale positioniert. Nach ca. 10 min war die Agarose ausgehärtet und die Platzhalter konnten vorsichtig entfernt werden. Danach wurden die Silikonhalterungen in den Agarosegussformen platziert, sodass jeweils zwei der *Posts* in eine Gussform ragten (Abb. 2.2).

Für jede Zellkulturschale wurde separat in einem Rundbodengefäß die Zellsuspension aus der Kardiomyozytenpräparation mit den weiteren Bestandteilen des *Mastermix* vermischt. Die Gefäße wurden während der gesamten Prozedur auf Eis gelagert. Für die Herstellung von 24 EHTs wurden 17×10^6 Kardiomyozyten eingesetzt (Endkonzentration $5,0 \times 10^6$ Zellen/ml). Das entsprechende Volumen wurde aus der Zellsuspension entnommen und mit Nichtkardiomyozytenmedium (NKM) auf ein Gesamtvolumen von 2960 μ l aufgefüllt. Anschließend wurden 187 μ l 2x konzentriertes DMEM (20% 10x DMEM, 20% Pferdeserum inaktiviert, 4% Hühnerembryonenextrakt, 2% Penicillin/Streptomycin, 54% H₂O) und 86,6 μ l Fibrinogen-Lösung hinzugefügt.

2 Material und Methoden

Tabelle 2.2: Herstellung EHT-Mastermix.

Reagenz	Volumen [μ l]
17 x 10 ⁶ Kardiomyozyten	
2x konzentriertes DMEM	187
Fibrinogen-Lösung	86,6
NKM	ad 3333

Tabelle 2.3: Herstellung NKM.

Reagenz	
Fetales Kälberserum (FKS, hitzeinaktiviert)	10%
Penicillin/Streptomycin	1%
Glutamin	1%
	in DMEM

Tabelle 2.4: Herstellung 2x DMEM.

Reagenz	
10x DMEM	20%
Pferdeserum inaktiviert	20%
Penicillin/Streptomycin	2%
Hühnerembryonenextrakt	4%
	<i>In Aqua ad injectabilia</i>

Die Bestandteile wurden durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren mit einer serologischen Pipette sorgfältig durchmischt. Um eine vorzeitige Polymerisation des Fibrins im Mastermix zu verhindern, wurden für jedes EHT mit einer neuen Pipettenspitze 100 μ l des Mastermix entnommen, mit je 3 μ l Thrombinlösung vermischt und zügig unter Vermeidung von Blasenbildung in die Gussformen pipettiert. Nach der Polymerisation des Fibrins (1,5 - 2 Stunden im Inkubator) wurden die EHTs mit vorgewärmtem DMEM (37 °C) überschichtet. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation wurden die EHTs vorsichtig mit der Silikonhalterung aus der Gussform herausgelöst und in eine neue Zellkulturschale mit je 1,5 ml Zellkulturmedium pro *Well* überführt.

2 Material und Methoden

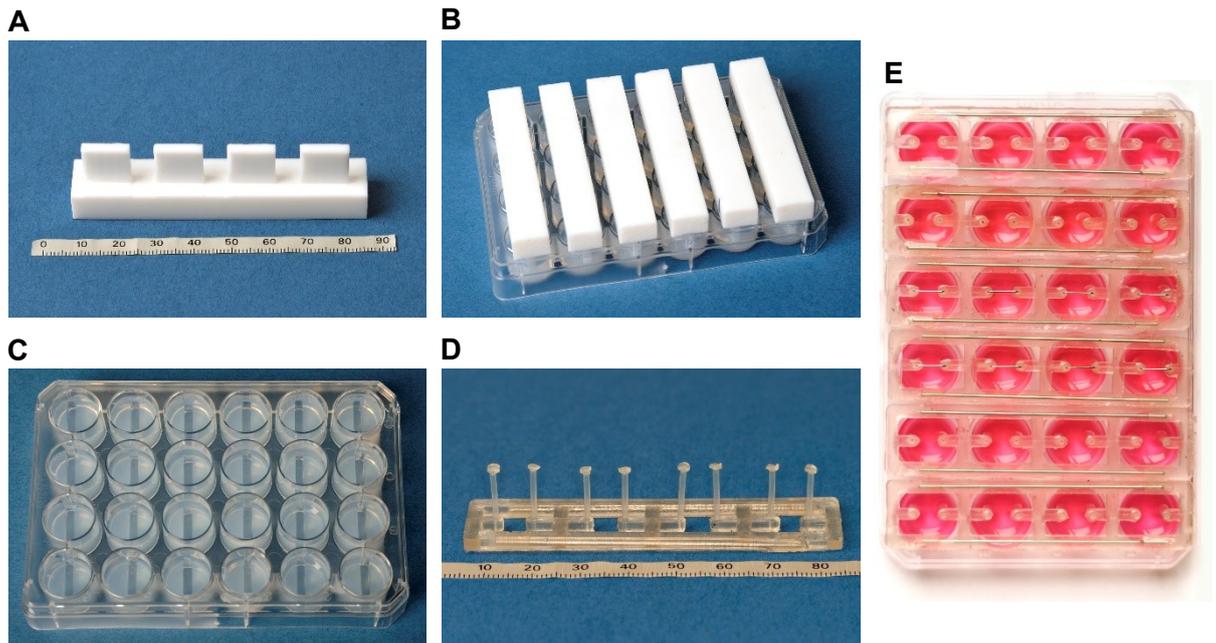


Abb. 2.2: Fotografische Darstellung des Ablaufes der Herstellung von EHTs im 24-Well-Format. A: PTFE-Spacer für 4 Wells. B: PTFE-Spacer positioniert in Zellkulturschale mit flüssiger Agarose. C: Fertige Agarosegussformen, in die jeweils 2 Posts der Silikonhalterungen (D) positioniert werden. E: Mit Nährmedium befüllte Zellkulturschale mit 24 EHTs. In den Halterungen in Zeile 3 und 4 sind Metallklammern zur Nachlasterhöhung zu erkennen.

2.6.5 Mediumherstellung und Mediumwechsel-Protokoll

Die EHTs wurden in einem Zellkultur-Inkubator bei 37 °C, 7% CO₂ und 40% O₂ kultiviert. Der erste Mediumwechsel erfolgte am ersten Tag nach der Herstellung und im Folgenden jeden Montag, Mittwoch und Freitag. Das Medium wurde zu jedem Wechsel frisch angesetzt und setzte sich wie folgt zusammen: DMEM, 10% inaktiviertes Pferdeserum, 2% Hühnerembryonenextrakt, 1% Penicillin/Streptomycin, Insulin (10 µg/ml) und Aprotinin (33 µg/ml). Ab dem 10. - 14. Tag wurden die Kulturbedingungen auf ein serumfreies Medium umgestellt, um unerwünschte Effekte durch im Pferdeserum enthaltene undefinierte Komponenten, wie Hypertrophie-induzierende Hormone zu vermeiden. Hierzu wurde der Anteil des Pferdeserums zunächst für 1 - 2 Tage auf 4% reduziert. Anschließend erfolgte für die Dauer von einer Woche ein täglich ein Mediumwechsel mit dem oben beschriebenen Medium ohne Pferdeserum unter Substitution der Hormone Trijodthyronin (T₃; 0,5 ng/ml) und Hydrokortison (HK; 50 ng/ml).

Tabelle 2.5: Zusammensetzung verschiedener Zellkulturmedien.

Medium mit Pferdeserum	Medium ohne Pferdeserum
10% inaktiviertes Pferdeserum	
2% Hühnerembryonenextrakt	2% Hühnerembryonenextrakt
Insulin (10 µg/ml)	Insulin (10 µg/ml)
Aprotinin (33 µg/ml)	Aprotinin (33 µg/ml)
	Trijodthyronin (0,5 ng/ml)
	Hydrokortison (50 ng/ml)
in DMEM	in DMEM

2.6.6 Interventionen zur Induktion der Hypertrophie

Für die Intervention zur Induktion einer Hypertrophie der Kardiomyozyten wurden die EHTs am zweiten Tag unter pferdeserumfreien Kulturbedingungen in drei Gruppen eingeteilt. In der Gruppe der EHTs, welche eine Hypertrophie durch Nachlastserhöhung erfahren sollten, wurden handgefertigte Metallklammern unter sterilen Bedingungen in die Silikonschläuche eingebracht (siehe Abbildung 2.4). Hierbei wurde darauf geachtet, eine mögliche Verletzung der EHTs durch Zugbelastung so gering wie möglich zu halten. Die Negativ-Kontrollgruppe wurde weiterhin unter den oben genannten Bedingungen kultiviert. Das Medium der Positiv-Kontrollgruppe wurde zur pharmakologisch induzierten Zellhypertrophie täglich mit dem α_1 -Adrenorezeptoragonisten Phenylephrin (PE; 20 µmol/l) versetzt.

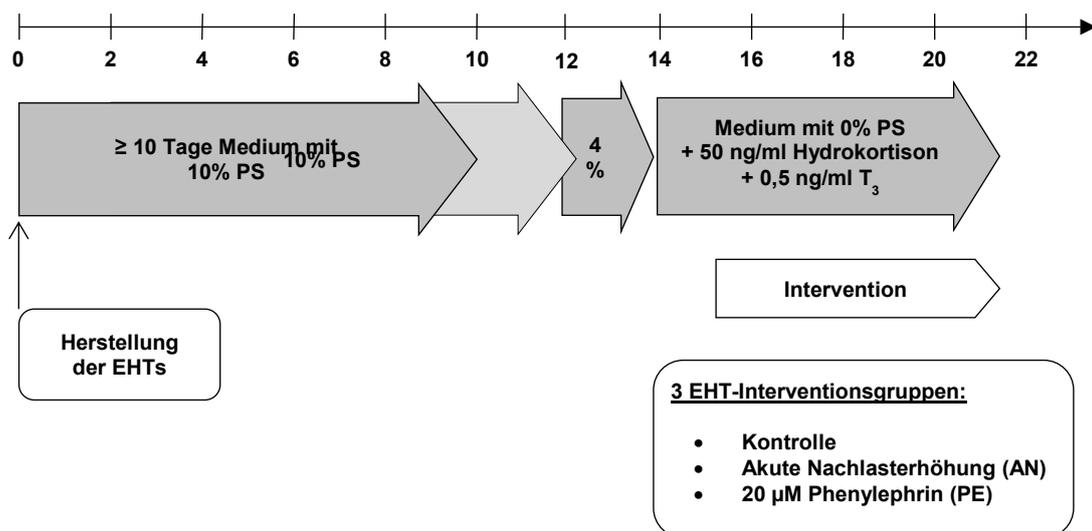


Abb. 2.3: Ablauf der Zellkultur. Bis zum Beginn der Hypertrophie-induzierenden Interventionen wurden alle EHTs unter gleichen Bedingungen kultiviert. Alle zwei Tage erfolgten videooptische Messungen, sobald eine makroskopisch sichtbare Auslenkung der Silikonschläuche zu erkennen war, in der Regel ab dem siebten Tag.

2 Material und Methoden

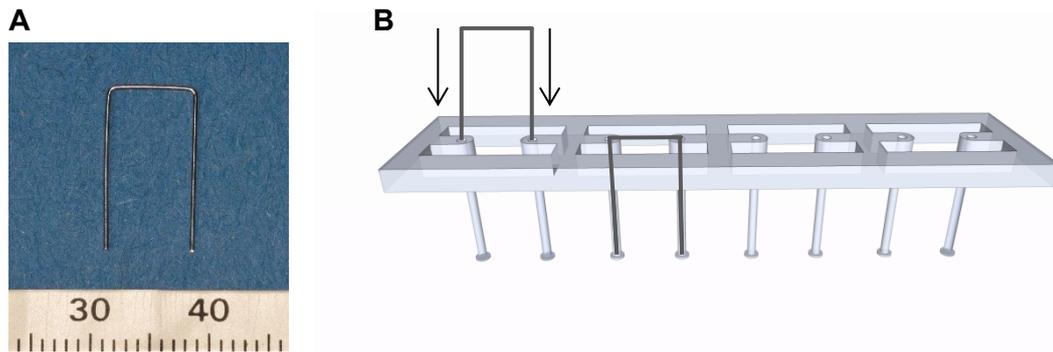


Abb. 2.4.: Verstärken der Silikonschläuche. A: Fotografische Abbildung der Metallklammer. B: Schematische Darstellung: die Metallklammer wird mit einer Pinzette von oben in die offenen Silikonschläuche eingebracht.

2.6.7 Interventionen zur Testung demethylierender/methylierender Substanzen

Untersucht wurden die Substanzen Hydralazin und 5'-Aza-2'-deoxycytidin als DNA-Methylierungsinhibitoren, sowie Trichlorethylen (TCE), welches in verschiedenen Versuchen ein hypermethylierendes Potential gezeigt hat (Collier et al. 2003; Csoka und Szyf 2009; Kao et al. 2011; Fatima et al. 2012; Dawson und Kouzarides 2012). Hierzu wurden zunächst, wie oben beschrieben, EHTs im 24-Well-Format hergestellt und nach dem oben beschriebenen Protokoll kultiviert. Am 20. Zellkulturtag wurde dem pferdeserumfreien Zellkulturmedium jeweils entweder Hydralazin (100 μM), 5-Aza-2'-deoxycytidin (100 μM) oder TCE (Verdünnung 1:100 000) hinzugegeben. Es wurde eine Negativ-Kontrollgruppe mit lediglich pferdeserumfreiem Zellkulturmedium mitgeführt. Für die folgenden fünf Tage bis zum Versuchsende erfolgte täglich ein Wechsel der Zellkulturmedien.

2.6.8 Videooptische Messung funktioneller Parameter

Die Messung der Kontraktionsparameter der EHTs erfolgte mit einer durch die Arbeitsgruppe Hansen et al. eigens angefertigten Apparatur zur videooptischen Analyse. Die Anlage bestand aus einem kleinen Zellkultur-Inkubator im Tischformat, welcher an seiner Oberseite mit einem Sichtfenster ausgestattet war. Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Gaszusammensetzung wurden automatisch reguliert. Über der Glasscheibe befand sich eine CCD-Kamera, welche an einem Achsen-System dreidimensional beweglich angebracht war. Zur Messung konnte die entsprechende Zellkulturschale geschlossen in den Inkubator gesetzt werden. Mit Hilfe der entsprechenden Software (Consulting Team Machine Vision, CTMV, Pforzheim) konnte die Kamera, vom Computer aus gesteuert, die einzelnen EHTs abfahren und über einen definierten Zeitraum filmen. Während der Messung wurden die einzelnen EHTs von unten durch eine Leuchtdiode beleuchtet. Das System verfügte über eine in der Software verankerte Figurerkennung, mit deren Hilfe über den Abstand zweier

2 Material und Methoden

festgelegter, automatisch am Kontrast erkannter Punkte auf dem Bild des EHTs dessen Verkürzung während der Kontraktion gemessen werden konnte. Basierend auf der Geometrie der Silikonposts, deren Auslenkung sowie der Beschaffenheit der eingesetzten Silikonschläuche (Elastizitätsmodulus vereinfacht linear 198 mN/mm^2) wurde automatisch die Kontraktionskraft sowie die Kontraktions- und Relaxationszeit berechnet.

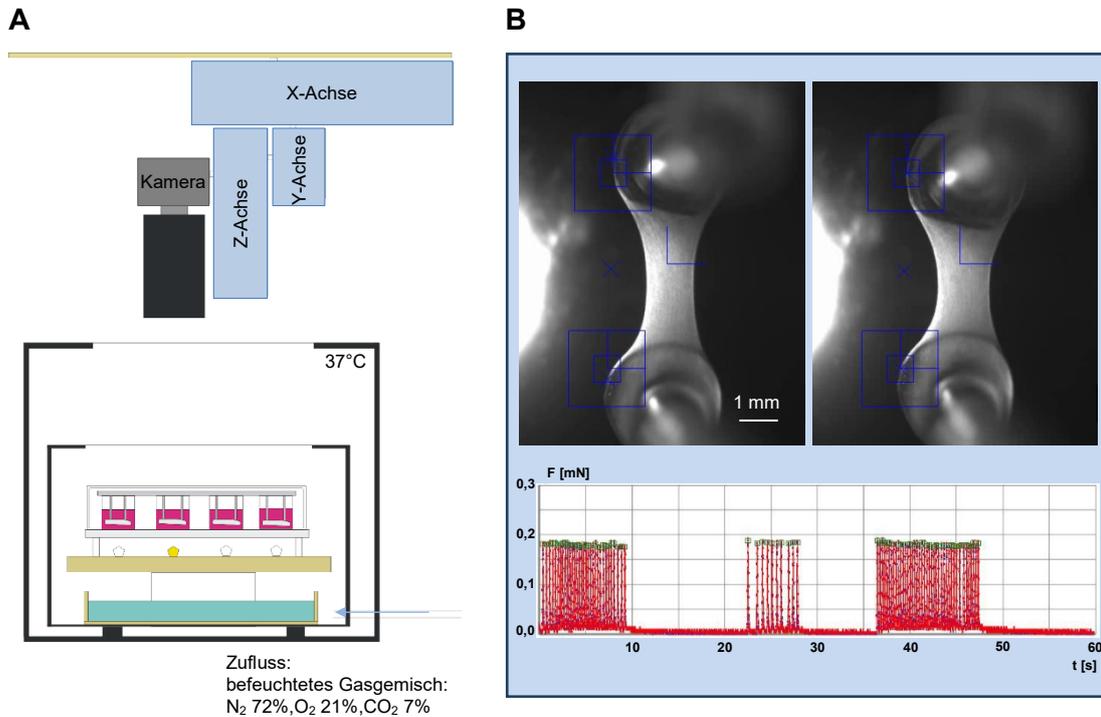


Abb. 2.5: Videooptische Messung funktioneller Parameter. A: Schematische Darstellung der Messapparatur. Die Kamera ist über ein 3-Achsensystem über einem Tischinkubator mit Sichtfenster befestigt. Es erfolgt eine manuelle Adjustierung der optischen Erkennung der EHTs. Anschließend werden die einzelnen Positionen der Zellkulturschale softwaregesteuert abgefahren und die von unten beleuchteten EHTs jeweils über eine Minute gemessen. B: Aufnahme eines EHTs in Relaxation und Kontraktion mit einer exemplarischen Messkurve von Kraft und Frequenz.

2 Material und Methoden

2.6.9 Ernte der EHTs

Nach 18 - 22 Tagen Zellkultur wurden die EHTs geerntet. Hierzu wurde eine Zellkulturplatte im 24-Well-Format mit vorgewärmter phosphatgepufferter Kochsalzlösung (*Phosphate-Buffered Saline*; PBS) befüllt. Es wurde je eine Silikonhalterung mit 4 EHTs aus dem Medium in PBS überführt, um Bestandteile des Zellkulturmediums auszuwaschen. Nacheinander wurden die EHTs vorsichtig mit einer Pinzette fixiert, sodass der Mittelteil des Gewebes abgeschnitten werden konnte. Das Gewebe wurde dann zügig in einem fest verschlossenen 2 ml-Reaktionsgefäß, mit Hilfe von flüssigem Stickstoff, schockgefroren und bis zur weiteren Prozessierung bei -80 °C gelagert. Das Zellkulturmedium wurde zur Messung der Glukosekonzentration aufbewahrt.

2.6.10 Ermittlung des Glukoseverbrauchs

Im Anschluss an die Ernte der EHTs wurde aus dem Zellkulturmedium der Glukoseverbrauch pro EHT bestimmt. Diese Bestimmung erfolgte zunächst mithilfe eines Blutgasanalysators (ABL90 FLEX, Radiometer GmbH). Aufgrund der besseren Durchführbarkeit wurde zu Beginn der Versuchsreihe auf die Benutzung eines handelsüblichen Blutzuckermessgerätes zur Blutzucker-Selbstmessung (Contour, Bayer) umgestellt. Eine Messreihe zur Überprüfung der Vergleichbarkeit zeigte eine ausreichend gute Korrelation der Messergebnisse beider Geräte (siehe Ergebnisse). Für die Messung mithilfe des Handgerätes wurde ein Volumen von circa 5 µl Zellkulturmedium mit einer Pipette entnommen und nach Anweisung des Herstellers am Sensor des Handgerätes aufgebracht. Das Ergebnis konnte innerhalb weniger Sekunden abgelesen werden. Für die Berechnung des Glukoseverbrauchs pro EHT wurde eine Messreihe zur Ermittlung des Ausgangswertes in frisch angesetzttem pferdeserumfreiem Zellkulturmedium durchgeführt.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 RNA/DNA-Isolation

Für die simultane Isolation von DNA und RNA aus einem einzelnen EHT wurden die beiden kommerziell erhältlichen Silikagel-basierten Säulen-Sets der Firma Qiagen *RNeasy Mini-Kit* und *DNeasy Blood and Tissue-Kit* kombiniert. Hierfür war es erforderlich, einen Lysepuffer zu verwenden, der mit den DNA- bzw. RNA-Bindebedingungen der Zentrifugationssäulen beider Kits kompatibel war und somit eine optimale Ausbeute an DNA und RNA aus den kleinen Gewebeproben ermöglichen würde. Ein zusätzlicher Proteinverdau mithilfe von Proteinase K war zudem notwendig, da der hohe Anteil an Fibrin in den EHTs die Zentrifugationssäulen verstopfen und somit die Bindung der Nukleinsäuren verhindern würde. Der Lysepuffer setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 2.6: Zusammensetzung Lysepuffer.

Reagenz	Volumen [µl]
Tris/EDTA-SDS-Puffer (30 mM Tris HCl, pH 7,4, 10 mM EDTA, 1% SDS)	300
Proteinase K	20
RNase Inhibitor (RNase OUT)	3
Gesamtvolumen	323

Für die Isolation von DNA und RNA wurden zunächst zwei EHTs mit ähnlichem Glukoseverbrauch aus einer Interventionsgruppe in jeweils einem 2 ml-Reaktionsgefäß zusammengebracht. Es wurden 323 µl des beschriebenen Lysepuffers sowie eine Edelstahlkugel hinzugefügt und das Gewebe anschließend in einem Qiagen *TissueLyser* für 2 min bei 30 Hz mechanisch homogenisiert. Anschließend wurden die Stahlkugeln mit einem Magneten entfernt und es folgte eine Inkubation zur biologischen Lyse (Heizblock, 1 h 45 min, 56 °C). Zur Isolation der Nukleinsäuren wurde das Lysat nun im Verhältnis 2:1 (DNA:RNA) aufgeteilt und mit Hilfe der kommerziell erhältlichen Kits weiterverarbeitet.

2.7.1.1 RNA-Isolation

Dem Lysat wurden 350 µl Guanidiniumthiocyanat-enthaltender RLT-Puffer und 350 µl Ethanol (70%) hinzugegeben und die Bestandteile durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vermischt, bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Im Weiteren wurde mit dem *RNeasy Mini-Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben verfahren. Dieses kombiniert die selektiven Bindungseigenschaften einer Silikagel-basierten Membran mit einer Mikrozentrifugations-Technologie, sodass RNA-Moleküle mit einer Größe von unter 200 Nukleotide selektiv

2 Material und Methoden

ausgewaschen wurden. Die auf diesem Wege angereicherte RNA wurde in jeweils 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.7.1.2 DNA-Isolation

Das Lysat wurde mithilfe eines Vortex-Mischers für 15 Sekunden durchmischt. Anschließend wurden 200 µl AL-Puffer (Qiagen; Bestandteil des Kits) hinzugefügt. Die Probe wurde erneut durchmischt und für 10 min bei 56 °C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol (96-100%) wurde die Probe auf die Zentrifugationssäule gegeben. Im Folgenden wurde nach Angaben des Herstellerprotokolls verfahren. Die isolierte DNA wurde anschließend in 80 - 100 µl AE-Puffer eluiert und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

Der DNA- und RNA-Gehalt der Proben, sowie die Reinheit wurden mithilfe eines Nanodrop-Photometers (ND-1000; Thermo Fisher Scientific) gemessen. Die DNA- und RNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm (E260) ermittelt. Eine optische Dichte (OD) von 1 entsprach einer Konzentration von 40 µg/ml. Die Reinheit der Proben konnte durch die Quotienten E260/E280 und E260/E230 bestimmt werden. Eine Wellenlänge von 280 nm stellt das Absorptionsmaximum für Proteine und Phenol dar, sodass ein Quotient E260/E280 $<1,8^*$ (DNA) beziehungsweise $<2,0^*$ (RNA) auf eine Kontamination mit Proteinen oder Phenol hinweisen kann, welche die korrekte Quantifizierung von DNA oder RNA stört (*Werte gelten nur für Nukleinsäuremessung in neutralen bis leicht alkalischen Puffern). Ein hoher E230-Wert reflektiert Verunreinigung z.B. durch Kohlenhydrate, Peptide, Phenol oder aromatische Verbindungen.

2.7.2 RNA-Analysen

2.7.2.1 Reverse Transkription

Für die cDNA-Synthese wurde das *High-Capacity cDNA Reverse Transcription*-Kit (Applied Biosystems) verwendet. Die Reagenzien und die vorab präparierte RNA wurden auf Eis aufgetaut und gekühlt pipettiert. Für jede Reaktion wurde eine Menge von 100 - 400 ng RNA in ein 200 µl-Reaktionsgefäß pipettiert und mit nukleasefreiem Wasser auf ein Volumen von 18 µl aufgefüllt. Der Mastermix setzte sich wie folgt zusammen:

2 Material und Methoden

Tabelle 2.7: Zusammensetzung Mastermix RT.

Reagenz	Volumen [μ l]
10x RT-Puffer	2,5
25x dNTP-Mix (100 mM)	1,0
10x <i>RT Random Primers</i>	2,5
<i>MultiScribe Reverse Transcriptase</i>	1,0
Gesamtvolumen	7,0

Es wurden jeweils 7 μ l Mastermix mit 18 μ l verdünnter RNA in ein 250 μ l-Reaktionsgefäß gegeben. Die Polymerasereaktion erfolgte im Weiteren gemäß den Herstellerangaben. Die synthetisierte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.7.2.2 Quantitative Echtzeit-PCR (RT-qPCR) zur Bestimmung der mRNA-Konzentration

Der relative mRNA-Gehalt und somit das Expressionsniveau der zu untersuchenden Gene wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR mit einem *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems) bestimmt. Hierzu wurde *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (2x; Fermentas) nach Herstellerangaben verwendet. Das im Mastermix enthaltene *SYBR Green I* ist ein fluoreszierender Farbstoff, welcher in doppelsträngige DNA interkaliert. Unter der Bindung wird ein Fluoreszenzsignal emittiert, welches sich proportional zur cDNA-Konzentration verhält. Das Signal wurde über alle Zyklen der PCR photometrisch erfasst. Durch die Verwendung spezifischer Primer und durch die Anzahl an Zyklen, die benötigt wurde, um einen bestimmten Schwellenwert zu erreichen, konnte der relative RNA-Gehalt in der Ausgangsprobe berechnet werden.

Die cDNA wurde im Verhältnis 1:20 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Es wurde für jedes zu untersuchendes Transkript ein Primermix aus je 10 μ l gelöstem *Forward*- und *Reverse*-Primer in 80 μ l nukleasefreiem Wasser angesetzt. Alle Proben wurden in Dreifachbestimmung mit einem Gesamtvolumen von je 10 μ l wie folgt pipettiert:

2 Material und Methoden

Tabelle 2.8: Zusammensetzung Mastermix qPCR.

Reagenz	Volumen [μ l]
<i>Maxima SYBR Green Master Mix</i>	5,0
Nukleasefreies Wasser	2,5
Primermix	0,5
Verdünnte cDNA	2,0
Gesamtvolumen	10,0

Tabelle 2.9: Ablauf qPCR.

Stufe/ Zyklen	Temp. [$^{\circ}$ C]	Zeit [min]
1	50	2:00
	95	10:00
2/40	95	0:15
	60	1:00
3	85	5:00

Eine Liste der verwendeten Primersequenzen ist im Kapitel 2.4 beigefügt. In allen Versuchen kamen Mikrotiterplatten im 384-Well-Format zum Einsatz. Die Analyse der Messwerte erfolgte mit der *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System Software*, Version 2.3 (SDS2.3) unter Verwendung der $\Delta\Delta$ Ct-Methode. Die Werte wurden hierbei als n-fache Expression, normalisiert auf ein Referenzgen als interne Kontrolle sowie auf die biologischen Kontroll-Proben angegeben. Der Algorithmus sei im Folgenden kurz dargestellt:

(1) Δ Ct=Ct-Ct_{ic}

(2) $\Delta\Delta$ Ct= Δ Ct- Δ Ct_{ktr.}

(3) Expression = $2^{-(\Delta\Delta$ Ct)} (Arany 2008).

* *Cycle Threshold* (Ct), *Cycle Threshold* der Kontrollgene (*Internal Control*; ic; Ct_{ic}), *Cycle Threshold* der Kontrolle (Ct_{ktr.}),

Δ Ct_{ktr.} = Mittel der Δ Ct-Werte der einzelnen Kontrollen.

Als Referenzgen diente 18s rRNA. Zusätzlich wurde für jede Echtzeit-PCR durch Abbildung einer Schmelzkurve die Bildung von Primer-Dimeren und weiteren PCR-Nebenprodukten ausgeschlossen.

2 Material und Methoden

2.7.3 DNA-Analysen

2.7.3.1 Mechanische Fragmentierung der genomischen DNA

Die aus den Proben isolierte genomische DNA (vgl. oben) wurde mit Hilfe von Ultraschall (Branson S-450A, beziehungsweise Diagenode Bioruptor UCD-600 NGS) durch indirekte Beschallung gleichmäßig in Fragmente mit einer Größe von 500 bis 800 Basenpaaren fragmentiert. Aufgrund des kleinen Probenvolumens und um mögliche Hitzeentwicklung durch Kavitation sowie eine Schmierkontamination der Proben durch Eintauchen einer Arbeitsspitze zu verhindern, wurde hierfür ein Becherresonator mit Umlaufkühlung genutzt. Die Proben wurden im fest verschlossenen Reaktionsgefäß in den vorgekühlten Becherresonator getaucht und bei 60% Amplitude (240 Watt) über 20 Zyklen à 20 Sekunden beschallt. Aus der gescherten DNA konnten nun die methylierten Fragmente mit Hilfe eines MBD-Bindungsassays angereichert und analysiert werden.

2.7.3.2 Anreicherung methylierter DNA mittels *MethylCap*-Kit (Diagenode)

Diese Methode basiert auf der Bindung methylierter DNA an ein Methyl-DNA-Bindeprotein, welches an magnetische Partikel gekoppelt ist. Hierbei handelt es sich um ein Fusionsprotein, bestehend aus einer methylbindenden Domäne (MBD) des humanen MeCP2 (*Methyl-CpG binding Protein 2*) und einer Glutathion-S-Transferase am C-terminalen Ende des Fusionsproteins. Letztere stellt eine Verbindung zu den Glutathion-beschichteten Metallpartikeln her. Die ungebundene, unmethylierte DNA wird in mehreren Schritten ausgewaschen, während die methylierte DNA über die gebundenen Metallpartikel mit Hilfe eines Neodym-Magneten fixiert wird. Anschließend wird die nun angereicherte methylierte DNA in einem speziellen Puffer eluiert und von den magnetisch fixierten Partikeln getrennt. Bei der Durchführung der Versuche wurde im Wesentlichen nach Herstellerangaben verfahren. Aufgrund der geringen Gewebemenge, welche zur Extraktion der DNA zur Verfügung stand, und aufgrund der dementsprechend geringen Konzentration an fragmentierter genomischer DNA wurde allerdings von der Herstellerempfehlung abweichend zunächst für jede Probe ein Reaktionsgemisch nach folgendem modifiziertem Protokoll in 200 µl-Reaktionsgefäßen angesetzt:

Tabelle 2.10: Zusammensetzung Reaktionsgemisch *MethylCap*-Kit.

Reagenz	Volumen [μ l]/Konzentration
Fragmentierte DNA (in AE-Puffer gelöst)	35 [19,71-22,86 ng/ μ l]
Puffer B	84
<i>MethylCap</i> -Protein	1
Gesamtvolumen	120

Es musste darauf geachtet werden, dass insgesamt maximal die Hälfte der fragmentierten DNA jeder Probe für die Anreicherung eingesetzt wurde, da noch einmal die exakt gleiche Menge fragmentierter DNA als Referenzprobe (*Input*-DNA) zur Quantifizierung benötigt wurde.

Im Weiteren wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die nun angereicherte DNA wurde nach Protokoll in einem einzigen Schritt mit 150 μ l *High Elution Buffer* eluiert, anschließend aufgereinigt (vgl. unten) und mittels quantitativer Echtzeit-PCR analysiert.

2.7.3.3 Anreicherung methylierter DNA mittels *MethylCollector Ultra*-Kit (**Active Motif**)

Die *MethylCollector Ultra*-Methode basiert auf einem Proteinkomplex bestehend aus *Methyl-CpG binding Domain 2b* (MBD2b), welches methylierte DNA mit hoher Affinität bindet, und - *Methyl-CpG binding Protein 3-like-1* (MBD3L1), welches selbst nicht an methylierte DNA bindet, im Komplex mit MBD2b jedoch dessen Affinität erhöht. Der Komplex aus methylierter DNA und Protein interagiert mit nickelbeschichteten, magnetischen Partikeln. Nicht-methylierte DNA-Fragmente werden in mehreren Waschschritten entfernt. Anschließend wird der DNA-Protein-Komplex enzymatisch mit Proteinase K gespalten. Der Ablauf sei im Folgenden kurz dargestellt:

1. Verdünnung der fragmentierten DNA auf eine Konzentration von 26,66 ng/ μ l,
2. Vorbereitung eines *Low Salt Binding Buffers* nach Anweisung des Herstellers,
3. Ansatz des Reaktionsgemisches nach modifizierten Protokoll mit Reagenzien des Kits in 200 μ l Reaktionsgefäßen (siehe Tabelle 2.11),
4. Inkubation auf dem Windrad-Mischer (1 h, 4 °C),
5. Platzierung der Reaktionsgefäße am Stabmagneten, Abpipettieren des Überstandes,
6. vier Waschschriffe: Resuspension des Pellets in jeweils 200 μ l *Binding Buffer*, sorgfältiges Durchmischen, Platzierung am Stabmagneten, Entfernung des Überstandes,
7. Ansatz des Elutionspuffers mit Proteinase K nach Herstellerangaben,

2 Material und Methoden

8. Aufnahme der Proben in je 100 µl Elutionspuffer, Inkubation (50 °C, 50 min, Inversion alle 5 min),
9. Zentrifugation, Versetzen der Proben mit je 2 µl vorgewärmter *Proteinase K Stop Solution*,
10. Fixierung der Metallpartikel mittels Stabmagnet, Überführung des Überstandes mit der nun angereicherten methylierten DNA in ein neues Reaktionsgefäß.

Dieser Prozess der DNA-Anreicherung wird im Weiteren als „*Pulldown*“ bezeichnet. Anschließend wurde die DNA aufgereinigt und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2.11: Zusammensetzung Reaktionsgemisch MethylCollector Ultra-Kit.

Reagenz	Volumen [µl]/Konzentration
<i>Magnetic Beads</i>	10
<i>Complete Binding Buffer (low salt)</i>	50
Fragmentierte DNA (in AE-Puffer gelöst)	30 [26,66 ng/µl]
His-MBD2/MBD3L1- Proteinkomplex	10
Gesamtvolumen	100

Insgesamt stand maximal die Hälfte der fragmentierten DNA jeder Probe für den Pulldown zur Verfügung, da analog zur Anreicherung mittels *MethylCap*-Kit noch einmal die exakt gleiche Menge fragmentierter DNA als Referenzprobe (*Input*-DNA) zum Vergleich benötigt wurde.

2.7.3.4 Aufreinigung der DNA

Da jede Form von Verunreinigung der Proben die quantitative Echtzeit-PCR zur Analyse des Methylierungsstatus der Promotoren stören würde, war es unbedingt notwendig, dem Pulldown-Assay eine Aufreinigung der Proben anzuschließen. Mit Hilfe des *High Pure PCR Product Purification*-Kit (Roche) wurden Reste von Proteinen sowie der Puffer entfernt. Hierbei wurde nach Protokoll des Herstellers verfahren.

2 Material und Methoden

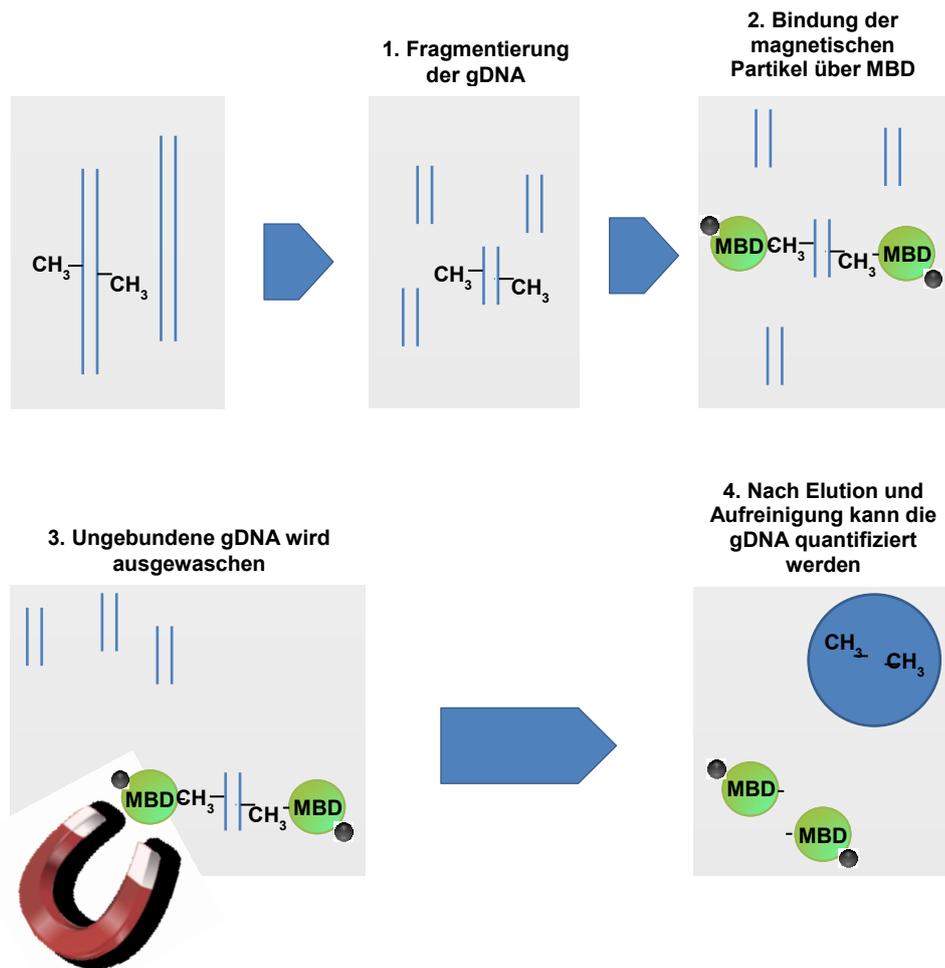


Abb. 2.6: Ablauf des Pulldown zur Anreicherung methylierter DNA. Die DNA wurde im Ultraschallbad fragmentiert, anschließend wurden methylierte Fragmente über ein Protein mit methylbindender Domäne an Glutathion-beschichtete magnetische Partikel (*Magnetic Beads*) gebunden. Während der anschließenden Waschschrte wurden diese magnetisch fixiert. Nach Elution und Aufreinigung konnte die methylierte DNA quantifiziert werden.

2.7.3.5 PCR zur Quantifizierung der methylierten genomischen DNA

Die so genannte Pulldown-Rate, also der relative Gehalt an methylierter DNA verglichen mit der Gesamt-DNA (*Input-DNA*), wurde durch quantitative Echtzeit-PCR mit einem *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System* unter Verwendung von *Maxima SYBR Green/ ROX qPCR Master Mix (2x; Fermentas)* bestimmt. Für jeden zu untersuchenden Promotor wurde ein spezifisches Primerpaar verwendet. Eine Liste der verwendeten Primersequenzen findet sich in Kapitel 2.5. Für jede zu untersuchende Probe lag zusätzlich zu dem Reaktionsgefäß mit der angereicherten methylierten gDNA die nicht angereicherte *Input-DNA* in einer definierten Konzentration vor. Anhand des Vergleichs dieser Proben wurde der relative Anteil der im Pulldown zurückbehaltenen DNA ermittelt und so ein Maß für deren Methylierung bestimmt. Die *Input-DNA* wurde auf eine Konzentration von 13,33 ng/µl verdünnt. Alle

2 Material und Methoden

Proben wurden in Dreifachbestimmung mit einem Gesamtvolumen von je 10 µl wie folgt pipettiert:

Tabelle 2.12: Zusammensetzung Mastermix qPCR.

Reagenz	Volumen [µl]/Konzentration
<i>Maxima SYBR Green Master Mix</i>	5,0
Nukleasefreies Wasser	1,0
Primermix	1,0 [20 pmol/µl]
<i>Input-DNA/Pulldown-DNA</i>	3,0
Gesamtvolumen	10,0

In allen Versuchen wurden Mikrotiterplatten im 384 *Well*-Format eingesetzt. Die Auswertung erfolgte erneut mit der SDS 2.3-Software.

Tabelle 2.13: qPCR-Programm ANP und BNP.

Nppa			Nppb			
Stufe/ Wdh.	Temp. [°C]	Zeit [min]	Stufe/ Wdh.	Incr. ¹ [°C]	Temp. [°C]	Zeit [min]
1	95	5:00	1		95	5:00
2/40	95	0:30	2/15		95	0:15
	63	0:30		-0,4	68,6	0:15
	72	1:00			72	1:00
3	95	0:15	3/25		95	0:15
	60	0:15			62,6	0:15
	95	0:15			72	1:00
4			4		95	0:15
					60	0:15
					95	0:15

¹ Incr. = Erhöhung (*Increase*) der Temperatur pro Wiederholung der PCR-Stufe im Rahmen eines *Touchdown*-PCR-Protokolls (siehe Kapitel 3.3.2).

Tabelle 2.14: qPCR-Programm Acta1 und Oxt/Ube2b.

Acta1				Oxt/Ube2b			
Stufe/ Wdh.	Incr. [°C]	Temp. [°C]	Zeit [min]	Stufe/ Wdh.	Incr. [°C]	Temp. [°C]	Zeit [min]
1		95	5:00	1		95	5:00
2/15		95	0:30	2/15		95	0:30
	-0,4	69	0:30		-0,4	68,9	0:30
		72	1:20			72	1:20
3/25		95	0:30	3/25		95	0:30
		63	0:30			62,9	0:30
		72	1:20			72	1:20
4		95	0:15	4		95	0:15
		60	0:15			60	0:15
		95	0:15			95	0:15

2.7.3.6 Primerdesign

Die für die Analyse der Promotoren verwendeten Primer wurden so ausgesucht, dass das entsprechende PCR-Produkt idealerweise den Bereich des Transkriptionsstart des zu untersuchenden Gens sowie eine mit dem Transkriptionsstart assoziierte CpG-Insel (siehe Kapitel 1.2.1) in einem Abschnitt mit einer Länge von 800 Basenpaaren in 5'-Richtung einschloss. CpG-Inseln wurden mit Hilfe des Programms *EMBOSS CpG-finder* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/>), sowie des *UCSC genome browsers* (<http://genome.ucsc.edu/>) identifiziert. Das Primer-Design erfolgte mit der Primer-Blast-Software des National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Die PCR-Bedingungen wurden für Primer zur Analyse genomischer DNA jeweils mittels *Touchdown*- und Gradienten-PCR optimiert (siehe Ergebnisse).

2.7.3.7 Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines einprozentigen Agarosegels wurde 1 g Agarose in 100 ml Tris-Base-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) gelöst. Nach einmaligem Aufkochen wurde die Lösung zur Färbung der PCR-Produkte mit 5 µl Ethidiumbromidlösung pro 100 ml TBE-Puffer versetzt. Im Anschluss wurde die Agaroselösung in einen geeigneten mit einem Gelkamm versehenen Gelschlitten gegossen. Nach dem Aushärten des Agarosegels wurde der Kamm entfernt und der Gelschlitten wurde in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt, so dass das Gel vollständig mit Puffer überdeckt war. Nun wurden die Taschen des

2 Material und Methoden

Gels mit den vorab mit 6x konzentriertem Ladebuffer (6x *Loading Dye*) vermischten PCR-Produkten bestückt. Im Allgemeinen wurde hierbei für ein Probenvolumen von 20 µl ein Volumen von 4 µl Ladebuffer verwendet. Nach etwa einer Stunde Laufzeit bei einer Spannung von 80 V waren die PCR-Produkte ausreichend aufgetrennt. Als Größenstandard wurde in allen Versuchen ein 100 Basenpaar-Marker auf dem Gel mitgeführt.

2.7.3.8 NimbleGen Whole Genome Methylation Chip

Es erfolgte eine genomweite Analyse der Promotormethylierung mittels *Roche NimbleGen Rat DNA Methylation 3x720K CpG Island Plus RefSeq Promoter Array*. Hierfür wurden zunächst wie in Kapitel 2.6.9 beschrieben Proben aus Kontroll-EHTs sowie EHT mit medikamentös induzierter Hypertrophie (Phenylephrin) und nach akuter Nachlasterhöhung gewonnen. Es wurden jeweils zwei EHTs der gleichen Gruppe zu einer Probe vereint. Als Qualitätskontrolle zur Auswahl der EHTs dienten jeweils der Glukoseverbrauch der einzelnen EHTs sowie das Ergebnis der videooptischen Messung. Es erfolgte die Isolation von DNA und RNA wie in 2.7 beschrieben. Die Anreicherung methylierter DNA erfolgte mithilfe des *Diagenode MethylCap-Kits*, anschließend erfolgte die Aufreinigung der DNA (siehe Kapitel 2.7.3.4). Als Qualitätskontrolle diente die Transkriptionsanalyse mittels quantitativer PCR sowie die Einzelpromotoranalyse für ausgewählte Gene einschließlich der Positiv- und Negativkontrollgene Ubiquitin-Protein Ligase E2B (Ube2b), dessen Promotor in Kardiomyozyten als vollständig demethyliert gilt, und Oxytocin/Neurophysin 1 Prepropeptid (Oxt), dessen Promotor als vollständig methyliert gilt (Movassagh et al. 2010). Es erfolgte die Amplifikation der Proben mittels *GenomePlex Complete Whole Genome Amplification Kit* (WGA2 Kit, Sigma-Aldrich) nach Herstellerangaben. Anschließend wurden die Proben an das Leibniz-Institut für Arterioskleroserecherche (LIFA) der Universität Münster geschickt. Dort erfolgte die genomweite Promotoranalyse mittels *Roche NimbleGen Rat DNA Methylation 3x720K CpG Island Plus RefSeq Promoter Array* nach Angaben des Herstellers. Für jede Versuchsgruppe wurden jeweils *Input*- und *Pulldown*-DNA auf den *Array* hybridisiert. Das Einlesen der Rohdaten sowie die Extraktion der Intensitäten erfolgte mittels DEVA-Software. Anschließend erfolgte die Analyse in R (*Package Ringo*) zur Normalisierung mittels *Tukey-Biweight Scaling*. Zur Qualitätskontrolle wurden Methoden des R-Packages "limma" verwendet. Zur Identifizierung von differenziell methylierten Regionen wurde ein *Window Sliding Approach* implementiert, die Fenstergröße wurde auf 4 *Probes* festgesetzt. Die relevanten Referenzsequenzen im Bereich des Transkriptionsstartpunktes (nach UCSC Genome Browser, Baylor Human Genome Sequencing Center rat genome assembly rn3.4, 2004, RefSeq assembly ID GCF_000001895.3) wurden im Bereich von -3000 bis +800 Basenpaaren (bp; relativ vom Transkriptionsstartpunkt) von *Probes* mit einer Länge von 50

2 Material und Methoden

bp mit einem Abstand von jeweils 100 Basenpaaren abgedeckt (siehe auch Kapitel 3.6.3 im Abschnitt Ergebnisse).

2.8 Statistische Methoden

Die Daten werden in dieser Arbeit präsentiert als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (*Standard Error of the Mean*, SEM). Mit n wurde die Anzahl der EHTs bzw. Einzelversuche/-proben bezeichnet. Die statistische Testung erfolgte mittels *Student's t-Test* für ungepaarte Messungen oder, bei mehr als zwei Versuchsgruppen, mittels *One-Way Analysis of Variance (ANOVA)* mit anschließendem *Dunnett's Multiple Comparison-Test* (im Folgenden Dunnetts Post-Test) oder mit anschließender Bonferroni-Korrektur ermittelt. Die Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism 5 durchgeführt. P-Werte kleiner 0,05 wurden als signifikant bewertet. In den Abbildungen wird das Signifikanzniveau in Form von Sternchen angezeigt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Für den *NimbleGen Rat Methylation 3 x 720 k CpG Island Plus RefSeq Promoter Array* wurden die Werte dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (*Standard Deviation*, SD). Die statistische Testung wurde mittels *One-Way ANOVA* des Mittelwertes jeweils vier benachbarter *Probes* mit anschließender Adjustierung für multiples Testen durch Bestimmung der *False Discovery Rate (FDR)* nach Benjamini-Hochberg durchgeführt. Das Signifikanzniveau beträgt $p = 0,05$.

3 ERGEBNISSE

Ziel der Arbeit war es, zu untersuchen, ob charakteristische Veränderungen in der Genexpression in Kardiomyozyten nach Exposition gegenüber verschiedenen prohypertrophen Stimuli mit ebenso charakteristischen Veränderungen in der Promotormethylierung einzelner Gene einhergehen würden. Hierzu nutzten wir das durch Hirt et al. (2012) bereits etablierte *in vitro*-Modell der kardialen Hypertrophie im EHT-Format. In diesem Modell werden EHTs zur Induktion einer pathologischen Hypertrophie für 7 Tage einer 12-fach erhöhten Nachlast (Akute Nachlasterhöhung; AN) bzw. 20 μ M des α_1 -Adrenozeptor-Agonisten Phenylephrin (PE) ausgesetzt. Vor Beginn der Methylierungsanalyse war es jedoch zunächst erforderlich kleinere Optimierungen am bestehenden EHT-Modell der kardialen Hypertrophie durchzuführen. Zudem musste, wie unter dem Abschnitt Methoden beschrieben, eine Extraktionsmethode für den Gewinn von DNA und RNA aus einer kleinen Gewebeprobe entwickelt werden. Anschließend erfolgte die Etablierung eines so genannten Pulldown-Assays zur Bestimmung der Methylierungsrate einzelner Promotorbereiche für Gene des fetalen Genprogrammes. In Kapitel 3.5.2 und 3.6.2 sind exemplarisch die Ergebnisse zur Einzelpromotoranalyse sowie korrespondierende Transkriptionsdaten aus EHTs für zwei verschiedene Versuchsreihen mit unterschiedlichen Pulldown-Protokollen dargestellt. Nach Etablierung des Pulldown-Protokolls mit dem *MethylCollector Ultra* (Active Motif) war der rekombinante His-MBD2b/MBD3L1-Proteinkomplex, auf welchem die Methode im Wesentlichen basiert, durch den Hersteller nicht mehr lieferbar. Es bestand somit die Notwendigkeit das bestehende Protokoll an das *MethylCap-Kit* (Diagenode), welches auf der methylbindenden Domäne des MeCP2-Proteins basiert, anzupassen. Da diese beiden Proteine potentiell unterschiedliche Affinität zu Bindungsstellen an CpG-Elementen aufweisen (siehe auch Kap. 1.2.1 und Frage et al. 2003) entschlossen wir uns, die bislang durchgeführten Versuchsreihen in Gänze zu wiederholen, weshalb sie im Folgenden auch für beide Kits dargestellt werden. Nach Etablierung dieser Methoden erfolgte die genomweite Analyse mittels *NimbleGen Whole Genome Methylation Array*, deren Ergebnisse gesondert dargestellt sind. Zuletzt erfolgten erste Versuche der Beeinflussung der DNA-Methylierung mittels verschiedener DNA Methyltransferase-(DNMT-) Inhibitoren.

3.1 Optimierung des Zellkulturmediums

3.1.1 Trijodthyronin-Konzentrationen in Aliquots

Tierseren, welche den meisten Zellkulturmedien zugegeben werden, können durch enthaltene endogene Hormone - wie beispielsweise Katecholamine - in undefinierter Konzentration einen pro-hypertrophen Effekt auf das kultivierte Herzgewebe ausüben (Simpson et al. 1982). Auch EHT-Medium enthält in den meisten Fällen Pferdeserum (siehe Methoden, Kapitel 2.6.5). Um diese unkontrollierbare Variable auszuschalten, wurde in vorhergegangenen Versuchen ein Zellkulturprotokoll entwickelt, welches nach ca. 14 Tagen Zellkultur die Verwendung eines pferdeserumfreien Mediums unter Supplementierung von Trijodthyronin (T_3) in einer Konzentration von 0,5 ng/ml vorsah (Hirt et al. 2012). Der Effekt verschiedener T_3 -Konzentrationen auf das Kontraktionsverhalten der EHTs wurde durch Hirt et al. (2012) getestet. Letztlich entspricht die gewählte Konzentration von T_3 dem des Hormons im Zellkulturmedium mit 10 % Pferdeserum (0,7 ng/ml gesamt) und liegt knapp unterhalb der physiologischen humanen Serumkonzentration. Hierdurch sollte eine Vermeidung hypertropher Stimuli unter Erhalt einer ausreichenden Spontanaktivität erreicht werden. Zunächst resultierte die Umstellung auf das pferdeserumfreie Zellkulturmedium jedoch in einer drastisch reduzierten Spontanaktivität der EHTs, sodass sich nach siebentägiger akuter Nachlasterrhöhung kein hypertropher Effekt in Kontraktilität und Transkription, wie durch Hirt et al. (2012) beschrieben, reproduzieren ließ. Die zur Supplementierung verwendete T_3 -Lösung war bereits mehrere Monate bei -80°C gelagert worden und wurde jeweils für die Versuche frisch aufgetaut, so dass die Möglichkeit eines Spontanzerfalls über die Lagerungsdauer in Betracht gezogen werden musste. Um die tatsächliche T_3 -Konzentration dieser Lösung zu ermitteln und somit Information über die Stabilität der Substanz zu erhalten, erfolgte eine exemplarische Analyse im Institut für klinische Chemie.

3 Ergebnisse

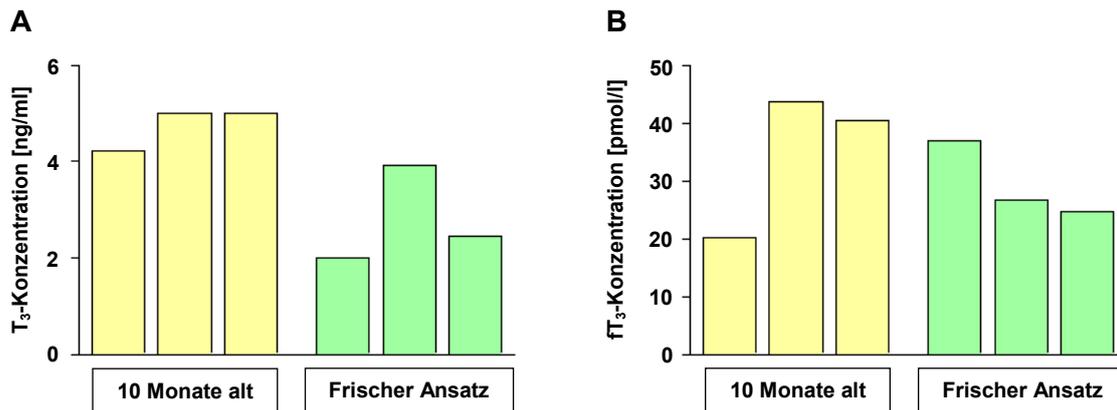


Abb. 3.1: T₃-Konzentration im frischen Ansatz verglichen mit 10 Monate lang gelagerter Lösung. Die Lösung wurde in einer Konzentration von 20 µg/ml angesetzt. Aus messtechnischen Gründen erfolgte eine Verdünnung der Proben im Verhältnis 1:10 000 für die T₃-Gesamtkonzentration (A), beziehungsweise 1:1 Mio. für die freie T₃-Konzentration (fT₃; B). Die erwartete Konzentration lag somit bei 2 ng/ml (T₃ gesamt), beziehungsweise 29 pmol/l (fT₃).

Der Vergleich der Messergebnisse beider Gruppen zeigt deutlich, dass sich die Konzentration von T₃ auch nach mehrmonatiger Lagerung in tiefgefrorenem Zellkulturmedium stabil hält, somit schlossen wir eine unzureichende T₃-Supplementierung als Ursache für die fehlende Spontanaktivität der EHTs aus.

3.1.2 Hydrokortisonsupplementierung im serumfreien Zellkulturmedium

Um auch während der Kultur im serumfreien Zellkulturmedium eine ausreichende Spontanaktivität der EHTs zu erhalten, erfolgte zusätzlich zu T₃ eine Supplementierung von Hydrokortison (HK). Hydrokortison ist neben Trijodthyronin eine gängige hormonelle Komponente serumfreier Medien. Um eine Dosierung mit relevanter Steigerung der Spontanaktivität der EHTs bei idealerweise möglichst physiologischer (den Serumbedingungen entsprechender) Konzentration zu finden, wurden zunächst zwei Konzentrationen mit einer Kontrollgruppe ohne Hydrokortisonsupplementierung verglichen.

3 Ergebnisse

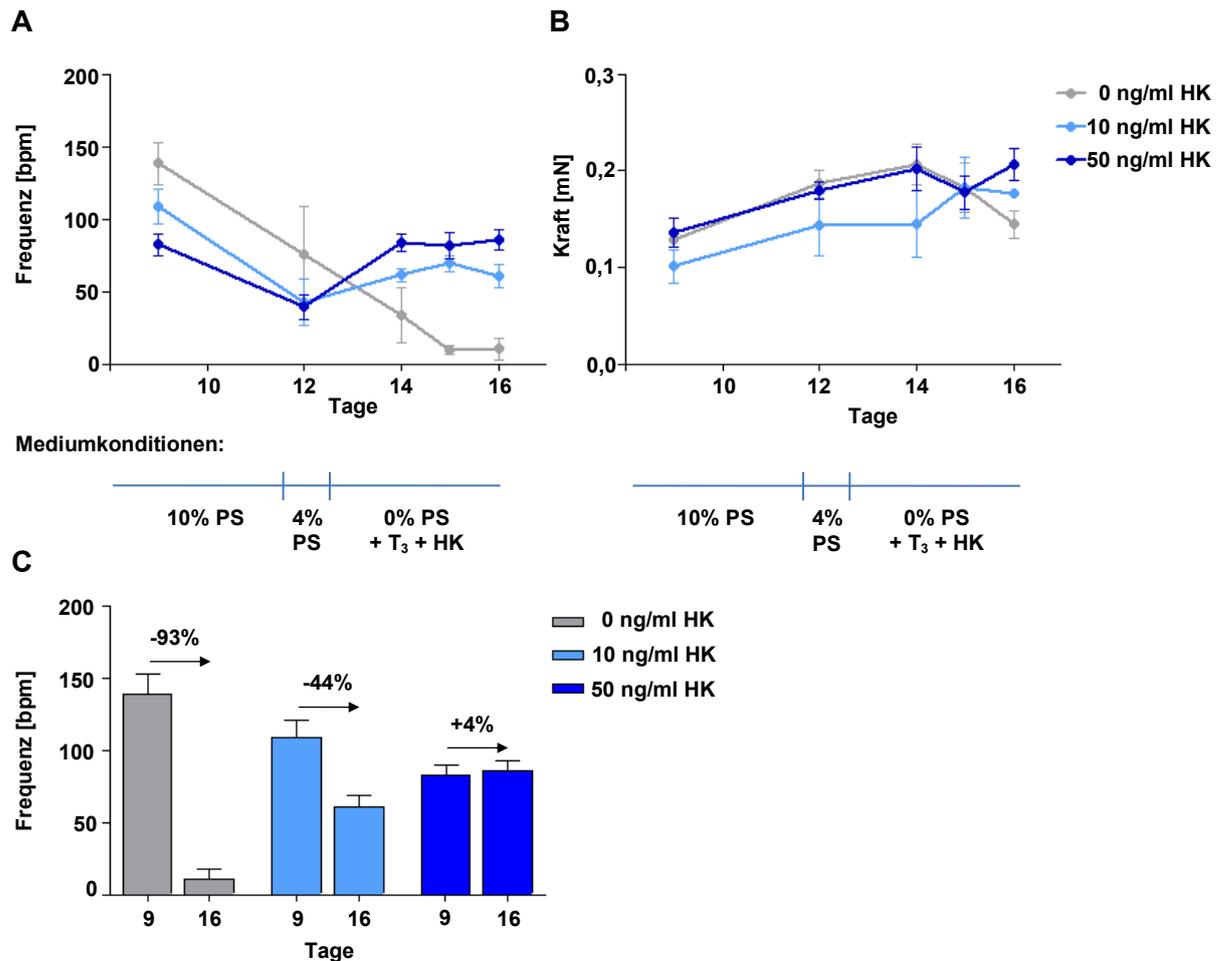


Abb. 3.2: Hydrokortison-Supplementierung. Dargestellt sind A: Frequenz in Schlägen pro Minute (bpm) und B: Kraft in Millinewton (mN) über die Zeit, gemessen an Tag 9, 12 und 14 bis 16 der Zellkultur. Bis Tag 12 wurden alle EHTs unter gleichen Medienbedingungen kultiviert, anschließend wurde der Pferdeserumanteil des Mediums auf 0% reduziert. Ab Tag 13 erfolgte die Supplementierung von T₃ (0,5 ng/ml), sowie, abhängig von der Gruppe, von 0 ng/ml, 10 ng/ml oder 50 ng/ml Hydrokortison. C: Prozentuale Veränderung der Schlagkraft von Tag 9 zu Tag 16. n = 4-8.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Schlagfrequenz der EHTs der Kontrollgruppe ohne Hydrokortisonsupplementierung bei gleichzeitiger Reduktion der Pferdeserumkonzentration stetig abnahm. Im Verlauf des Messzeitraumes kam es so zu einer Frequenzabnahme um 93%. Unter Hydrokortisonsupplementierung ist nach einer initialen Frequenzminderung wieder ein deutlicher Anstieg in der Schlagfrequenz zu erkennen, wobei unter der Konzentration von 10 ng/ml eine Frequenz von 56% der Ausgangsfrequenz erreicht wurde, während die Frequenz bei einer Konzentration von 50 ng/ml nahezu unverändert blieb. Wir entschlossen uns daher, Hydrokortison für folgende Versuche in einer Konzentration von 50 ng/ml im Zellkulturmedium zu supplementieren. Diese Konzentration entspricht einer humanen Serumkonzentration im unteren Referenzbereich.

3.2 Hypertrophie-Intervention und Qualitätskontrolle

Zur Hypertrophieinduktion in Kardiomyozyten wurden, wie in Kapitel 2.6.6 beschrieben, EHTs nach 14-tägiger Zellkultur und Ersatz von Tierseren im Zellkulturmedium den zwei verschiedenen Interventionsgruppen beziehungsweise der Kontrollgruppe zugeführt. Die Hypertrophieinduktion erfolgte entweder medikamentös durch Hinzugabe des α_1 -Agonisten Phenylephrin in das Zellkulturmedium oder mittels akuter Nachlasterhöhung. Für letztere wurden die Silikon-Posts, an welchen die EHTs befestigt waren, durch Einführen von Metallklammern verstärkt. Hierdurch erhöhte sich der Widerstand gegen welchen die EHTs zu schlagen hatten. Wesentliche Qualitätskriterien stellten Glukosemessungen im Zellkulturmedium und regelmäßige videooptische Messungen der Kontraktionsparameter dar.

3.2.1 Vergleich verschiedener Methoden zur Bestimmung der Glukosekonzentration im Medium

Vor der eigentlichen Untersuchung der DNA-Methylierung in EHTs sollten verschiedene Qualitätskriterien zur Sicherung eines tatsächlichen hypertrophen Effekts des *in vitro*-Modells etabliert werden. Hierzu orientierten wir uns im Wesentlichen an der Arbeit von Hirt und Sørensen et al. (2012). Als primäres Qualitätskriterium der EHTs diente ihr Glukoseverbrauch, zumal ein nennenswerter Glukoseverbrauch nur bei Kraft-entwickelnden EHTs stattfindet. So konnte aus der Glukosekonzentration grob abgelesen werden, ob die EHTs auch außerhalb des nur einminütigen Messzeitraums (siehe unten) regelmäßig geschlagen hatten. Darüber hinaus konnte die Glukosekonzentration herangezogen werden, um den Effekt von Phenylephrin auf Frequenz und Kraft zu bestätigen, da bei höherer Kraft und Frequenz ein höherer Glukoseverbrauch zu erwarten war.

Für diese Messungen wurde 24 Stunden nach dem letzten Medienwechsel aus selbigem die Glukosekonzentration bestimmt. Zunächst wurde hierfür ein Blutgasanalysegerät (ABL90 FLEX, Radiometer GmbH) verwendet, welches durch das Universitäre Herzzentrum zur Nutzung bereitgestellt wurde. Für die Messung wurde jeweils ein Teil des Mediums aus den Wells einer Zellkulturschale mit Einwegspritzen entnommen und anschließend einzeln analysiert. Nachteil dieser Methode war der beträchtliche Zeitaufwand bei höherer Probenanzahl sowie ein hoher Materialverbrauch und die damit verbundenen Kosten. Als Alternative stand die Nutzung eines handelsüblichen Blutglukosemessgerätes zum Heimgebrauch (Contour, Bayer) zur Verfügung. Zur Evaluation der Messgenauigkeit beziehungsweise der Vergleichbarkeit der Messergebnisse beider Geräte erfolgte die simultane Messung der Glukosekonzentration aus neun verschiedenen Proben.

3 Ergebnisse

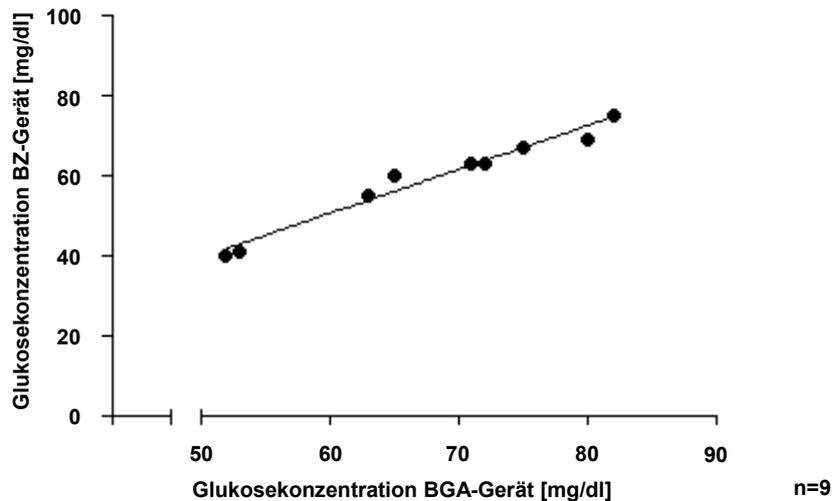


Abb. 3.3: Vergleich der Messmethoden zur Ermittlung der Glukosekonzentration im EHT-Medium. Gemessen wurde jeweils mit einem Blutgasanalysegerät (ABL90, Radiometer) sowie einem Blutzuckermessgerät (Contour, Bayer). Lineare Regression der Korrelation: Pearson $r = 0,9842$.

Die Abbildung zeigt eine gute Korrelation der beiden Messreihen. Mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,98$ ist von einem nahezu vollständigen positiven linearen Zusammenhang der Messwerte auszugehen, sodass die folgenden Messungen ausschließlich mit dem Handgerät durchgeführt wurden.

3.2.2 Kontraktilität und Glukoseverbrauch

Zur Erfolgskontrolle der Hypertrophie-Interventionen erfolgte die Untersuchung der Kontraktilität der jeweiligen EHTs mittels videooptischer Analyse. Hierzu wurden am 20. Zellkulturtag (5. Tag nach Intervention) zunächst die Metallklammern aus den Silikonhalterungen entfernt, um eine messbare Auslenkung der Posts durch die EHTs, welche der akuten Nachlasterhöhung ausgesetzt waren, filmen zu können. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von jeweils einer Minute pro EHT. Anschließend wurden die Metallverstärkungen wieder in die Halterungen eingeführt.

3 Ergebnisse

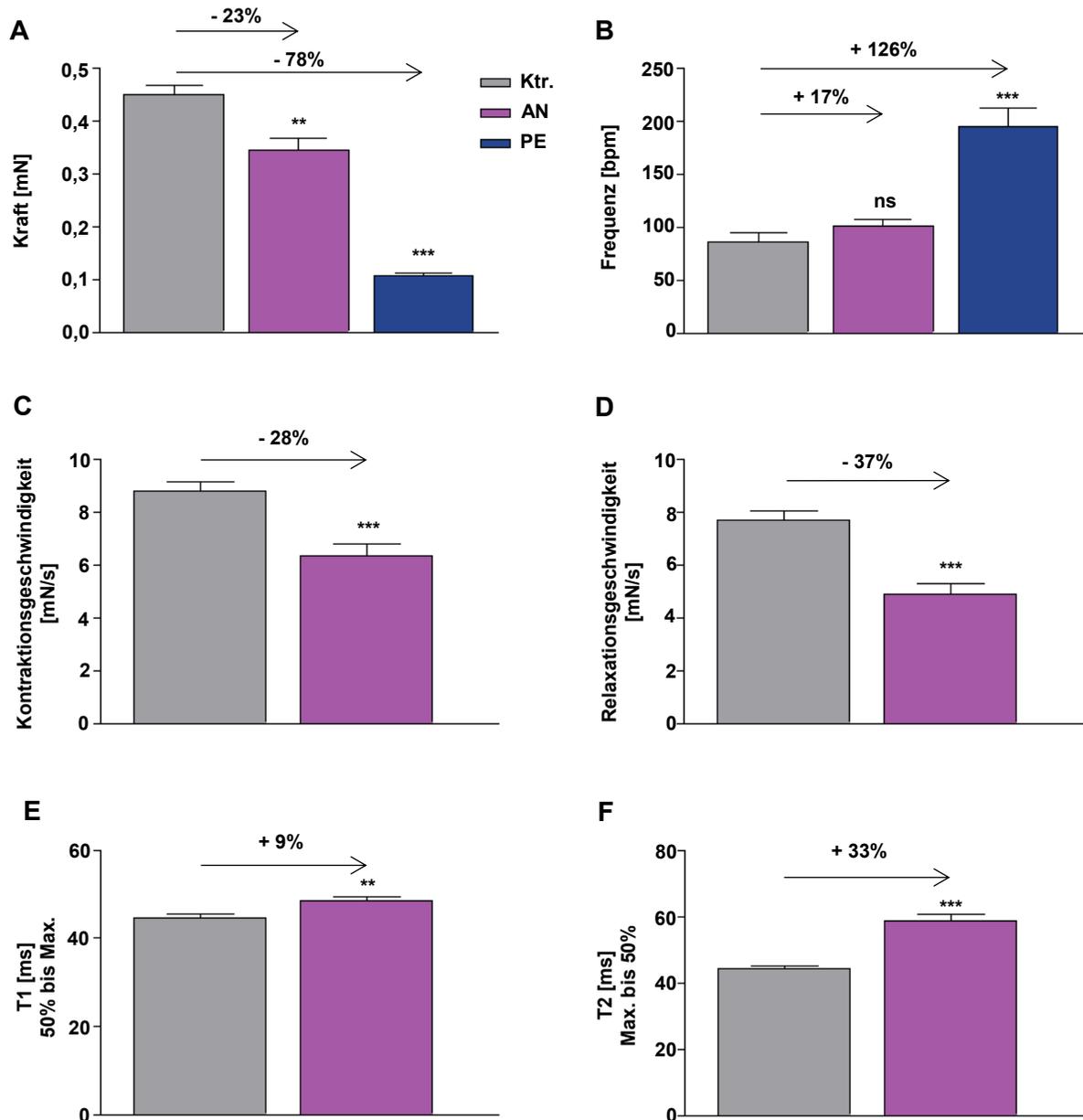


Abb. 3.4: Funktionelle Analysen. Dargestellt sind die Kontraktionsparameter am fünften Tag nach Beginn der pro-hypertrophen Intervention. Verglichen wurde die Kontrollgruppe jeweils mit den Interventionsgruppen akute Nachlasterhöhung bzw. Phenylephrin-Behandlung (Abb. A und B, Messwerte für die Phenylephrin-Gruppe für Abb.: C-F waren aufgrund der sehr geringen Schlagkraft technisch bedingt nicht zu erheben). A Kraft, B Frequenz, C Kontraktionsgeschwindigkeit, D Relaxationsgeschwindigkeit. E: Kontraktionszeit von 50% Kontraktionskraft bis zur maximalen Kontraktion (T1). F: Relaxationszeit von maximaler Kontraktion zu 50% (T2). n = 6-14, One-Way ANOVA, Dunnetts Post-Test. **p<0,01, ***p<0,001. Abb. C-F Students t-Test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

In den Interventionsgruppen mit Induktion einer pathologischen Hypertrophie der Kardiomyozyten zeigte sich eine deutlich eingeschränkte Kontraktilität im Vergleich zur Kontrollgruppe. Abbildung 3.4 A zeigt die deutlich niedrigere Schlagkraft mit -23% für die akute Nachlasterhöhung und sogar -78% für die pharmakologische Intervention. Währenddessen zeigte sich für die Nachlasterhöhung keine signifikante Veränderung der

3 Ergebnisse

Schlagfrequenz, während sich für die Phenylephrin-Gruppe erwartungsgemäß ein deutlich positiver chronotroper Effekt feststellen ließ. Aufgrund dieser Kombination von geringer Schlagkraft mit nur sehr geringer Auslenkung der Silikon-Posts und gleichzeitig hoher Schlagfrequenz ließen sich jedoch in dieser Versuchsreihe durch videooptische Messungen keine validen Kontraktilitäts-Messwerte in der Phenylephrin-Gruppe erheben. Im Folgenden verglichen wir daher die AN-Gruppe mit der Kontrollgruppe. Abbildung 3.4 C und D zeigen eine deutliche geringere Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit der EHTs in der AN-Gruppe. Weitere erhobene Kontraktilitätsdaten waren die Zeit, welche das EHT von halbmaximaler bis maximaler Kontraktion (T1), beziehungsweise von maximaler Kontraktion zu halbmaximaler Relaxation (T2) benötigt. Diese Parameter sind im Wesentlichen unabhängig von der Kontraktionskraft. Hier zeigte sich besonders die Relaxationszeit der EHTs der AN-Gruppe verlängert. Zusätzlich zur Messung der Kontraktilität konnten während der videooptischen Messungen EHTs identifiziert werden, welche nur eine unzureichende Adhäsion an den Silikonhalterungen zeigten, sodass nicht davon auszugehen war, dass ein Effekt durch die Verstärkung der Silikonhalterungen erreicht werden konnte. Diese EHTs wurden aus den weiteren Versuchen ausgeschlossen.

24 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel erfolgte, wie oben beschrieben, eine Messung der Glukosekonzentration im Zellkulturmedium. Der Glukoseverbrauch über 24 Stunden wurde anschließend errechnet. Hierzu wurde eine Glukosemessung im frisch angesetzten Zellkulturmedium durchgeführt und hieran die eingesetzte totale Glukosemenge errechnet. Anschließend wurde der Verbrauch an Glukose durch die EHTs über die im Zellkulturmedium verbliebene Glukosemenge errechnet. Mit Hilfe der Kontraktilitätsmessungen wurde für jedes einzelne EHT die Schlagfrequenz über eine Minute gezählt und die Gesamtschlagzahl über 24 Stunden errechnet, sodass für jedes EHT der Glukoseverbrauch pro Schlag ermittelt werden konnte. Diese ist exemplarisch in Abbildung 3.5 dargestellt. Unter der Annahme, dass der Glukoseverbrauch der EHTs einen Indikator für ihre Spontanaktivität darstellt, welche für einen Effekt der Nachlasterhöhung unabdingbar ist, wurden EHTs mit einem unterdurchschnittlich niedrigem Glukoseverbrauch ausgeschlossen.

3 Ergebnisse

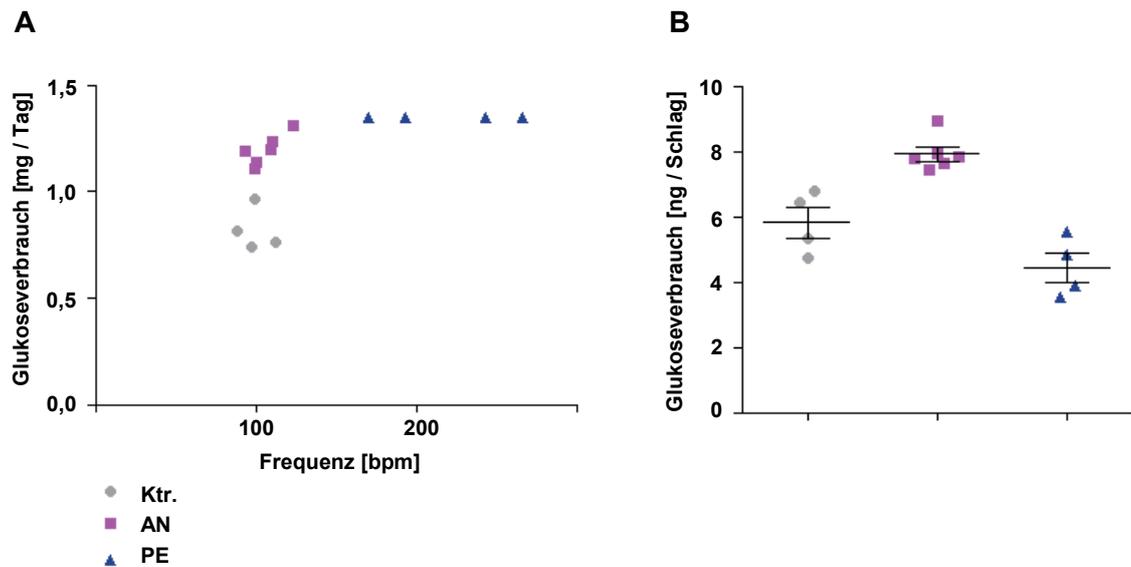


Abb. 3.5: Glukoseverbrauch der EHTs. A Errechneter Glukoseverbrauch der EHTs in Milligramm pro Tag im Verhältnis zur Frequenz in Schlägen pro Minute. Die Werte stellen jeweils den Mittelwert der zwei für die weiteren Analysen zusammengeführten EHTs dar. Die Messung des Glukoseverbrauchs der einzelnen EHTs wurde am letzten Tag der Zellkultur, 24 h nach dem letzten Mediumwechsel durchgeführt. Medium-Glukosekonzentrationen unter 10 mg/dl konnten mit dem von uns verwendeten Gerät nicht exakt ermittelt werden, sodass hier für weitere Berechnungen eine minimale Glukosekonzentration von 10 mg/dl eingesetzt wurde. B Absoluter Glukoseverbrauch pro Schlag in Nanogramm, dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

Die Glukosemessungen im Zellkulturmedium am 22. Tag der Zellkultur nach siebentägiger Intervention zeigten einen erhöhten Glukoseverbrauch (Gesamtmenge pro Tag) für die AN- und PE-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3.5 A). Der absolute Glukoseverbrauch pro Schlag war für die AN-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle erhöht, für die PE-Gruppe jedoch reduziert (Abbildung 3.5 B). Dieses ist durch einen nahezu vollständigen Verbrauch der im Zellkulturmedium verfügbaren Glukosemenge (1,5 mg) durch die EHTs der PE-Gruppe erklärlich. Die EHTs der PE-Gruppe zeigten jedoch weiterhin Spontanaktivität, was durch die Nutzung anderer Energieträger im Zellkulturmedium (Aminosäuren, Pyruvat, Lactat), Abbau von Kreatinphosphat und Glykogenolyse erklärlich ist. Es wurde bei nicht mehr messbarer Glukosekonzentration im Zellkulturmedium die maximal verfügbare Glukosekonzentration zur Berechnung eingesetzt, aufgrund der jedoch sehr hohen Schlagfrequenz ergibt sich somit ein entsprechend (falsch) niedriger Glukoseverbrauch pro Schlag. Zusätzlich ist auch ein geringerer Glukoseverbrauch bei mit der Zeit abnehmender Schlagkraft der EHTs denkbar, dieser lässt sich aber letztlich anhand der indirekten Ermittlung des Glukoseverbrauches nach dem von uns durchgeführten Protokoll aus oben genannten Gründen nicht exakt quantifizieren. Alternativ wäre der Einsatz eines Nährmediums mit höherem Glukosegehalt erforderlich, ein häufigerer Medienwechsel (2x täglich) ist nicht praktikabel.

3.3 Methodenetablierung Pulldown-Protokoll zur DNA-Methylierungsanalyse

3.3.1 Etablierung der DNA- und RNA-Extraktionsmethoden

Ziel war es, ein *in vitro*-Modell der kardialen Hypertrophie zur Untersuchung epigenetischer Fragestellungen zu etablieren. Um den Methylierungsstatus eines bestimmten DNA-Abschnitts untersuchen zu können, musste zunächst ein geeignetes DNA-Extraktionsprotokoll etabliert werden. Die DNA sollte anschließend fragmentiert und die methylierten DNA-Fragmente angereichert werden, um ein Maß für die abschnittsweise DNA-Methylierung zu erhalten (Pulldown, siehe Methodenteil und unten). Für die Anreicherung der methylierten DNA mittels *MethylCollector Ultra*-Kit (Active Motif) beziehungsweise *MethylCap*-Kit (Diagenode) wurde eine DNA-Menge von mindestens 1600 ng benötigt, wobei jeweils nur eine sehr geringe Gewebemenge, und somit auch nur eine geringe Menge DNA pro Probe zur Verfügung stand. Gleichzeitig war es notwendig, aus dieser geringen Gewebemenge sowohl RNA als auch DNA zu gewinnen, um Transkriptionsregulation und epigenetische Markierungen gleichermaßen analysieren zu können. Mit den hierfür zur Verfügung stehenden kommerziellen Kits wie dem *AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal*-Kit (Qiagen) oder *NucleoSpin TriPrep* (Macherey-Nagel) oder durch Extraktion mittels *TRIzol* (Life Technologies) konnte jedoch in keinem Fall eine ausreichende Konzentration an Nukleinsäuren bei gleichzeitiger guter Qualität erreicht werden, sodass eine alternative Extraktionsmethode etabliert werden musste. Wir entschlossen uns, zwei kommerzielle Kits (DNeasy, RNeasy; Qiagen) zu kombinieren, welche jeweils für sich die genannten Anforderungen für weitere Untersuchungen erfüllten. Somit war es erforderlich, einen gemeinsamen, möglichst einfachen Zellyse-Puffer zu finden, welcher mit den Bindungseigenschaften der verschiedenen Bindungssäulen kompatibel war. Als Basis diente ein Tris/EDTA-Puffer (TE-Puffer; pH 7,4) unter Hinzugabe des denaturierenden Detergens Natriumlaurylsulfat (SDS). Dieser wurde mit Proteinase K für den enzymatischen Verdau der Zellen und des Fibrins, sowie einem RNase-Inhibitor versetzt. Nach zusätzlichem mechanischem Zellaufschluss wurde das Lysat mit Ethanol und den jeweiligen Puffern des kommerziellen Kits versetzt. In Tabelle 3.1 (*AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal*-Kit, Qiagen) und 3.2 (modifiziertes Extraktionsprotokoll mit DNeasy/RNeasy, Qiagen) sind exemplarisch Konzentration und Reinheitsgrad für zwei verschiedene Methoden dargestellt. Mit der neu etablierten Methode zur Isolation von Nukleinsäuren konnte eine durchschnittliche DNA-Menge von 3623 µg pro Probe (n=12) isoliert werden, während wir mit Hilfe des *AllPrep*-Kits durchschnittlich 1240 µg pro Probe (n=10) und somit zu wenig DNA für den geplanten weiteren Versuchsablauf erhielten. Wie in 2.7.1.2 beschrieben, lässt sich anhand des

3 Ergebnisse

260/280-Quotienten die Qualität der isolierten DNA beurteilen. Mit der eigens für die Isolation aus geringen Gewebemengen etablierten Methode ließ sich die DNA, wie in diesem Beispiel zu erkennen ist, konstant in ausreichender Qualität gewinnen (Tab. 3.2). Dies war mit dem Kit nicht der Fall (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Photometrie nach DNA-Isolation mit *AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal-Kit*.

Probe	ng/µl	A260	A280	260/280
Ktr. 1	9,33	0,187	0,102	1,83
Ktr. 2	14,34	0,287	0,162	1,77
Ktr. 3	8,49	0,170	0,099	1,71
Ktr. 4	8,42	0,168	0,119	1,42
AN 1	10,74	0,214	0,132	1,62
AN 2	7,31	0,146	0,092	1,59
AN 3	9,11	0,182	0,096	1,91
PE 1	20,37	0,407	0,253	1,16
PE 2	20,62	0,412	0,241	1,71
PE 3	16,28	0,326	0,184	1,77

DNA aus EHTs der Kontrollgruppe, nach Intervention mittels akuter Nachlasterhöhung und nach Behandlung mit Phenylephrin.

Tabelle 3.2: Photometrie nach DNA-Isolation mit modifiziertem Protokoll.

Probe	ng/µl	A260	A280	260/280
Ktr. 1	34,19	0,684	0,342	2
Ktr. 2	38,07	0,761	0,364	2,09
Ktr. 3	29,25	0,585	0,276	2,12
Ktr. 4	46,38	0,928	0,429	2,16
AN 1	67,47	1,349	0,666	2,03
AN 2	65,06	1,301	0,648	2,01
AN 3	52,49	1,050	0,584	1,8
AN 4	59,27	1,185	0,577	2,06
PE 1	50,21	1,004	0,505	1,99
PE 2	34,97	0,699	0,309	2,26
PE 3	29,88	0,598	0,281	2,13
PE 4	36,18	0,724	0,346	2,09

Die in Tabelle 3.2 dargestellten Werte für die DNA-Isolation aus EHTs zeigt eine statistisch signifikant größere DNA-Ausbeute für die AN-Gruppe verglichen mit der Ktr.- und PE-Gruppe

3 Ergebnisse

(mittlere Abweichung Ktr. vs. AE = 24,1 ng/μl, AE vs. PE = 23,26 ng/μl). Hierbei handelte es sich jedoch nicht um eine regelhaft zu beobachtende Abweichung (siehe auch Tab. 3.3). Schwankungen in der DNA-Konzentration wurden durch die im Versuch eingesetzte Menge des Eluats korrigiert.

3.3.2 Primer-Optimierung zur Methylierungsanalyse

Der Einfluss der Methylierung von CpG-Inseln innerhalb des Promotorbereiches eines Gens auf dessen Expression ist am besten erforscht. Wir wählten deshalb solche Bereiche innerhalb von Genen mit bekannter Rolle in der pathologischen Hypertrophie zur Untersuchung der DNA-Methylierung im Zusammenhang mit ihrer Expression. Um einen aussagekräftigen DNA-Abschnitt innerhalb des Promotorbereiches unter Einschluss möglichst vieler und/oder großer CpG-Inseln abzubilden, wurden Primer für ein PCR-Produkt von ca. 800-1000 Basenpaaren Länge im Bereich des Promotors beziehungsweise des Transkriptionsstartpunktes des entsprechenden Gens entworfen. Dieses gestaltete sich schwierig, da der relativ hohe Anteil repetitiver Elemente, wie Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen, sowie an CpG-Dinukleotiden im Promotorbereich der genomischen DNA eine unspezifische Hybridisierung der Primer und somit die Bildung unspezifischer Nebenprodukte begünstigte.

Grundsätzlich erfolgt die PCR in drei Schritten, welche über circa 30 Zyklen wiederholt werden:

1. Denaturierung: Die DNA wird erhitzt (ca. 94 °C) und DNA-Doppelstränge voneinander getrennt,
2. Annealing: Die Temperatur wird (je nach Primer) auf ca. 55 °C gesenkt, Primer lagern sich an komplementäre Sequenzen der DNA-Einzelstränge an,
3. Elongation: Bei einer Temperatur von ca. 72 °C, abhängig von der verwendeten DNA-Polymerase, beginnt diese am 3'-Ende des Primers, einen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren.

Die Spezifität einer PCR ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig, ein wesentlicher Faktor ist die Schmelztemperatur (*Melting Temperature* T_m), bei welcher die Hälfte der DNA-Moleküle in Einzelsträngen vorliegt. Es existieren verschiedene Formeln, wie beispielsweise die „Wallace-Regel“: $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$, nach denen die Schmelztemperatur annäherungsweise berechnet werden kann. Da jedoch abgesehen vom Gehalt der einzelnen Nukleotide weitere Faktoren wie ihre Sequenz, die DNA-Konformation und -Konzentration sowie die Bedingungen des Puffers (Denaturierungsmittel, Salzkonzentration, pH-Wert) einen Einfluss auf die Kinetik von DNA-Dissoziation und -Reassoziaton haben, handelt es

3 Ergebnisse

sich bei dem hier errechneten Wert lediglich um eine grobe Näherung. In den von uns untersuchten Sequenzen lagen besonders CG-reiche DNA-Abschnitte vor, welche durch so genannte Stapelwechselwirkungen thermodynamisch besonders stabil sind. Sie erfordern damit einerseits eine höhere Schmelztemperatur und führen andererseits leicht zur Ausbildung von Primerdimeren, also kleinen PCR-Produkten, die durch sich überlappende Bindung der Primer aneinander entstehen. Erst durch die individuelle Optimierung eines geeigneten *Touchdown*-PCR-Protokolls mit Hilfe eines gradientenbasierten Ansatzes für jeden Primer konnte eine gute Spezifität für die meisten gewünschten PCR-Produkte erreicht werden. Das Prinzip der *Touchdown*-PCR beruht im Wesentlichen auf dem Prinzip, dass durch eine schrittweise Annäherung an die optimale Annealing-Temperatur, bei welcher der Primer mit der Ziel-DNA hybridisiert, unspezifische PCR-Produkte vermieden werden sollen. Die Annealing-Temperatur ist wiederum von den oben genannten Faktoren sowie der Primerlänge abhängig. Wird die Temperatur zu niedrig gewählt, kommt es zur Anlagerung von Primern an nicht vollständig komplementäre Sequenzen (insbesondere bei repetitiven Sequenzen), wird die Temperatur zu hoch gewählt, kommt es zu keiner Anlagerung. Im Gradientenansatz als Vorversuch für die PCR wurde durch einen Temperaturgradienten, welcher über das PCR-Gerät gebildet wird, DNA bei verschiedenen Annealing-Temperaturen amplifiziert, um die optimale Annealing-Temperatur für den jeweiligen Primer zu ermitteln. Für die *Touchdown*-PCR wird dann zunächst eine Annealing-Temperatur gewählt, welche oberhalb der errechneten Schmelztemperatur für den entsprechenden Primer liegt und anschließend, in Abhängigkeit von der gewählten Temperaturdifferenz, über ca. 10-15 PCR-Zyklen die Temperatur sukzessive reduziert, um eine möglichst spezifische Primerhybridisierung zu erreichen. So kommt es während der DNA-Amplifikation auch bei der Ausbildung unspezifischer Nebenprodukte bei niedrigen Temperaturen zu einem deutlich höheren Anteil des gewünschten (spezifischen) PCR-Produktes aus vorigen Zyklen, da die PCR bei der höheren Annealing-Temperatur zunächst zwar sehr ineffizient, aber sehr spezifisch verläuft (Korbie und Mattick 2008).

3 Ergebnisse

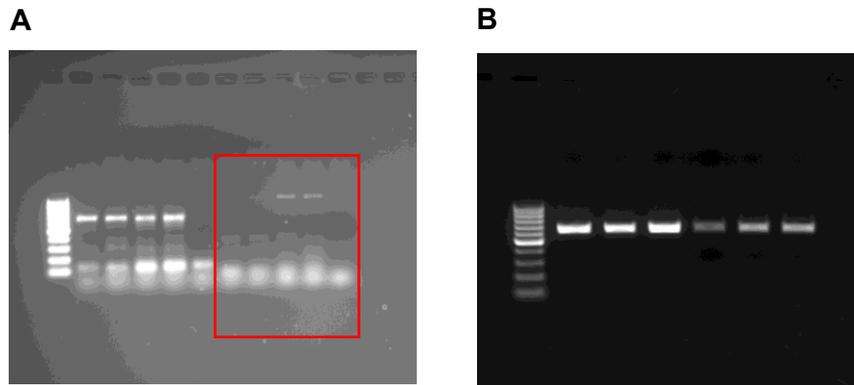


Abb. 3.6: Gelelektrophorese PCR-Produkte für den BNP-Promotor. Gewünschte PCR-Produkte hatten eine Größe von ca. 800 – 1000 bp. A: Roter Kasten: Aufgetrennte PCR-Produkte mit erstem BNP-Primer mit DNA in verschiedenen Konzentrationen, es sind deutliche Banden durch Primer bzw. Dimere aus Primern sowie unspezifische PCR-Produkte zu erkennen. B: Aufgetrennte qPCR-Produkte mit optimiertem Primer und Protokoll für: *Input* von Ktr., AN, PE und Pulldown von Ktr., AN, PE (von links nach rechts).

3.4 Transkriptionsanalyse und Einzelpromotormethylierung nach Pulldown-Protokoll mit *MethylCollector Ultra* (Active Motif)

3.4.1 Expressionsanalyse

Nach der Isolation von DNA und RNA der so ausgewählten EHTs erfolgte zunächst die Expressionsanalyse für Gene des so genannten fetalen Genprogramms. Hierdurch konnte der prohypertrophe Effekt der mechanischen beziehungsweise pharmakologischen Intervention auf die EHTs vor Analyse der DNA bestätigt werden (Hirt et al. 2012).

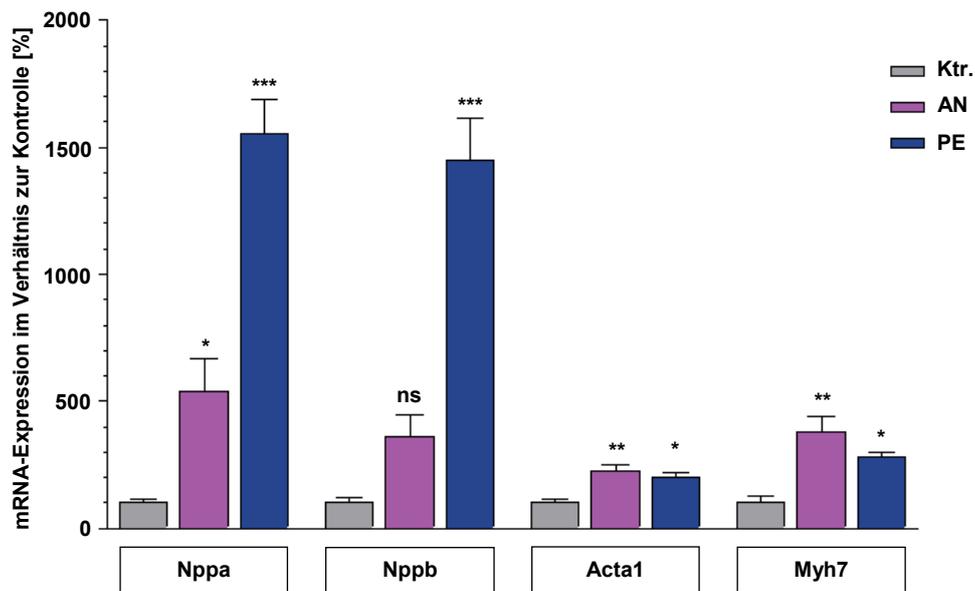


Abb.:3.7 Transkriptionsanalyse des fetalen Genprogramms. Dargestellt sind die Expressionsveränderungen ausgewählter Gene des fetalen Genprogrammes in Form der relativen mRNA-Konzentrationen in % nach pro-hypertropher Intervention bezogen auf die Kontrollgruppe. Gezeigt ist der Mittelwert + SEM, n = 4 mit je 3 technischen Replikaten, One-Way ANOVA, Dunnetts Post-Test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

In den EHTs der Interventionsgruppen akute Nachlasterhöhung und Phenylephrin konnte erwartungsgemäß eine vermehrte Expression der untersuchten Gene des fetalen Genprogrammes gezeigt werden (Abb. 3.7). Unerwartet war allerdings, dass die Nppb- (BNP) Expression in der AN-Gruppe nicht signifikant höher ausfiel als in der Kontrollgruppe.

3.4.2 Quantifizierung methylierter DNA nach Anreicherung mittels *MethylCollector Ultra*

Für die Analysen des Methylierungszustandes der einzelnen Promotoren war zunächst ein Protokoll für die Verwendung des *MethylCollector Ultra-Kits* (Active Motif) etabliert worden, welches auf einem MBD2b/3L1-Proteinkomplex basiert (s.o.). Aufgrund der begrenzten Menge an DNA, welche zur Analyse zur Verfügung stand, konnte nur eine sehr kleine

3 Ergebnisse

Auswahl an Promotoren untersucht werden. Hierzu wurden zunächst Promotorsequenzen des Oxytocin/Neurophysin 1 Prepropeptid- (Oxt) und des Ubiquitin-Protein Ligase E2B- (Ube2b) Gens gewählt, welche als Positiv- beziehungsweise Negativkontrolle dienen sollten (siehe Kapitel 2.7.3.8). Die natriuretischen Peptide (ANP und BNP) und α -skelettales Aktin (Acta1) stellen prototypische Vertreter des fetalen Genprogramms dar und sind wesentliche molekulare Marker der kardialen Hypertrophie (Dorn et al. 2003). Zudem zeigten diese drei Marker in der vorangegangenen Expressionsanalyse eine deutlich aktivierte Transkription in den Interventionsgruppen, sodass wir sie zunächst für die weitere Analyse der DNA auswählten.

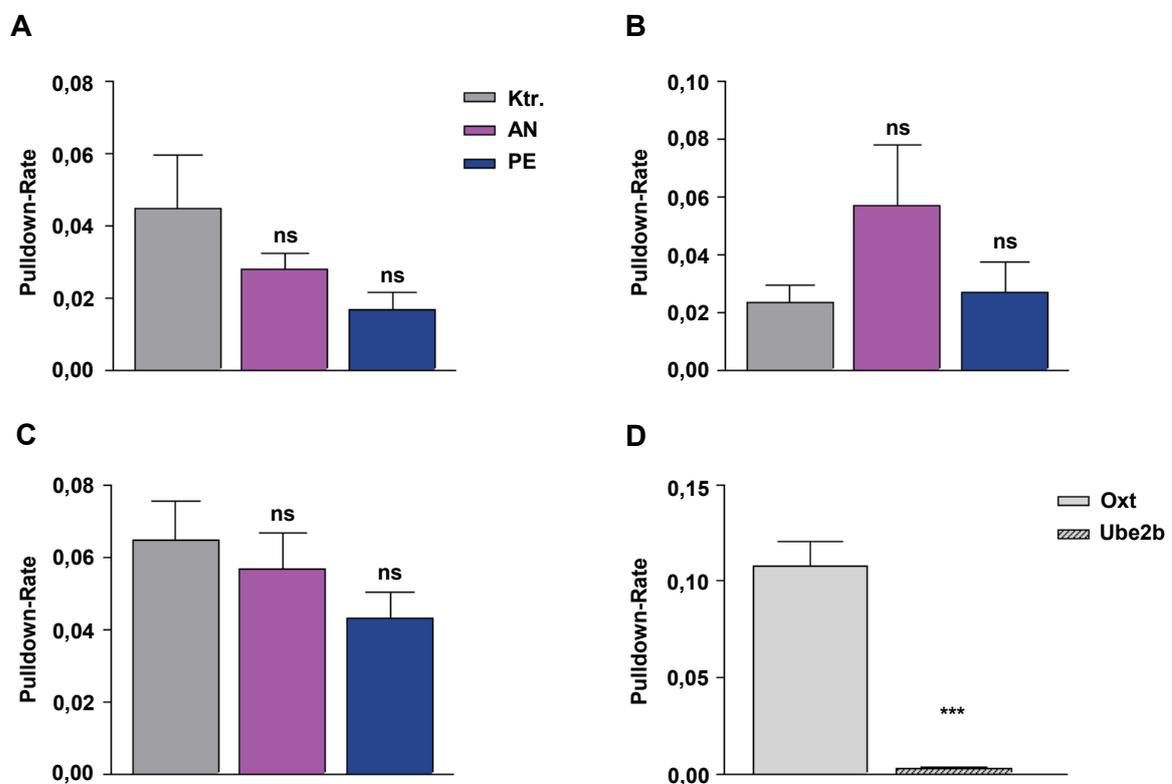


Abb. 3.8: Pulldown-Rate genomischer (methylierter) DNA im Verhältnis zur eingesetzten DNA-Gesamtmenge. A Pulldown-Rate für Nppa-Promotor. B Pulldown-Rate für Nppb-Promotor. C Pulldown-Rate für Acta1-Promotor. D Pulldown-Rate für Oxt- und Ube2b-Promotor als Beispiel einer nahezu vollständig methylierten bzw. demethylierten Promotorregion, untersucht wurde DNA der Kontrollgruppe. Abb. A-C: Gezeigt ist Mittelwert + SEM, n = 3-4 mit je 3 technischen Replikaten, One-Way ANOVA, Dunnetts Post-Test. Abb. D: Students t-Test für ungepaarte Messungen, n=3-4, ***p<0,001.

Abbildung 3.8 D zeigt eine Pulldown-Rate von 10% für den Oxt-Promotor sowie eine niedrige Pulldown-Rate für den Ube2b-Promotor. Somit ist anzunehmen, dass eine spezifische Anreicherung methylierter Fragmente erfolgte. Für die Promotorregionen ließ sich bei großer Schwankung der Messwerte innerhalb der Gruppen zunächst kein statistisch signifikanter Unterschied feststellen.

3 Ergebnisse

3.5 Transkriptionsanalyse und Einzelpromotormethylierung nach Pulldown-Protokoll mit *MethylCap-Kit* (Diagenode)

Im Verlauf der Versuche mit den obigen ersten Ergebnissen zur Promotormethylierung ergab sich die Notwendigkeit aufgrund von Lieferschwierigkeiten des Herstellers des MBD2b/3L1-Proteinkomplexes (Active Motif), die gut reproduzierbar etablierte Methode zur Anreicherung der methylierten DNA zu verlassen und eine weitere Methode unter Verwendung des *MethylCap-Kits* (Diagenode) zu etablieren. Die Methoden zur Evaluation der EHTs wurden analog zu den vorherigen Versuchen weitergeführt.

3.5.1 Expressionsanalyse

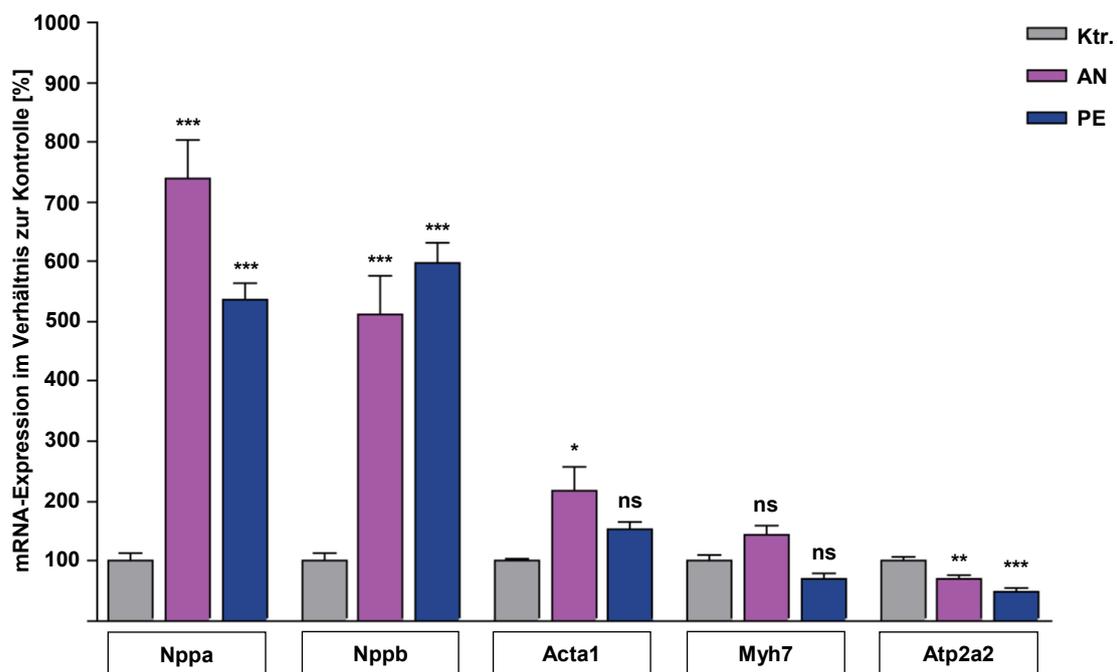


Abb. 3.9: Analyse von Transkripten des fetalen Genprogramms. Dargestellt sind die Expressionsveränderungen ausgewählter Gene des fetalen Genprogrammes in Form der relativen mRNA-Konzentrationen in % bezogen auf die Kontrollgruppe. Gezeigt ist Mittelwert + SEM, n = 4 mit je 3 technischen Replikaten, One-Way ANOVA, Dunnetts Post-Test, *p < 0,05, ***p < 0,001.

Insbesondere für die natriuretischen Peptide ANP und BNP zeigt sich eine mehr als fünffache Überexpression für beide Interventionsgruppen als Ausdruck der Aktivierung des fetalen Genprogrammes. Dieses entspricht in etwa den Ergebnissen weiterer Versuchsreihen (Kap 3.4.1 + 3.6.1.1), wobei sich hier eine deutlich geringere Streuung in der AN-Gruppe darstellt, was sich in der statistischen Signifikanz widerspiegelt. Insgesamt konnte dies als Anzeichen suffizienter Induktion einer Hypertrophie der Kardiomyozyten und somit als eine von mehreren Qualitätskontrollen für das Gelingen der Intervention gewertet

3 Ergebnisse

werden. Zusätzlich zu den in Abbildung 3.7 gezeigten Genen des fetalen Genprogramms wurde die Expression für die Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (Serca2a; ATP2a2), deren Herabregulation im hypertrophierten Herzen zu einem pathologisch veränderten Kalzium-*Handling* innerhalb der Kardiomyozyten führt, untersucht (Mudd and Kass 2008). Während für die β -Isoform der schweren Myosinkette (β -MHC, *β -myosin heavy chain*, Myh7) in diesem Versuch keine signifikante Differenz in der Expression nachzuweisen ist, ist für Serca2a in beiden Interventionsgruppen eine deutliche Herabregulation erkennbar.

3.5.2 Quantifizierung methylierter DNA nach Anreicherung mittels *MethylCap*-Kit

Analog zu Abbildung 3.8 erfolgte die Analyse der angereicherten DNA für die Kontrollgruppe sowie die beiden Interventionsgruppen, akute Nachlasterhöhung und Phenylephrin-induzierte Hypertrophie. Die Pulldown-Raten für Oxt und Ube2b wurden diesmal für jede einzelne Interventionsgruppe untersucht.

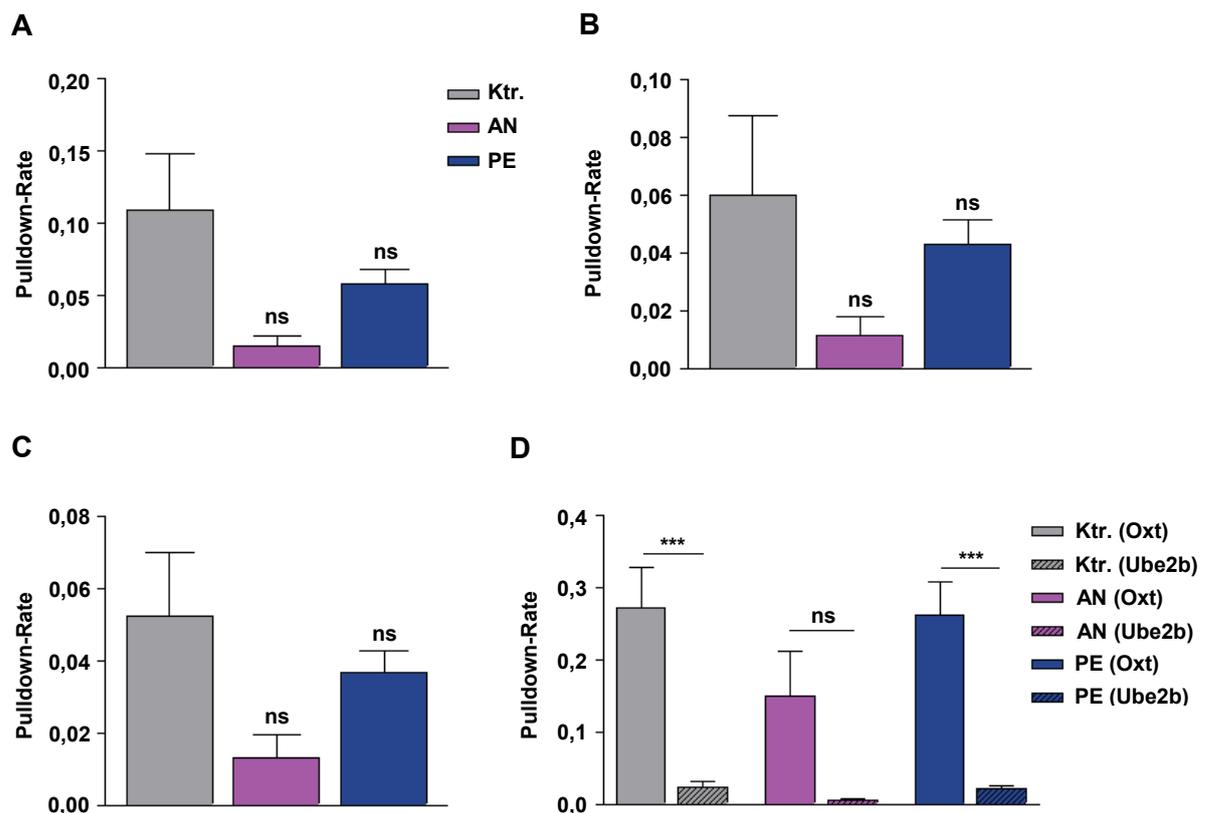


Abb. 3.10: Pull-down-Rate methylierter DNA im Verhältnis zur eingesetzten DNA-Gesamtmenge. A Pull-down-Rate für Nppa-Promotor. B Pull-down-Rate für Nppb-Promotor. C Pull-down-Rate für Acta1-Promotor. D Pull-down-Rate für die Kontrollgene Oxt und Ube2b. Abb. A-C Gezeigt ist Mittelwert + SEM, n = 3-4 mit je 3 technischen Replikaten, One-Way ANOVA, Dunnetts Post-Test. ns = nicht signifikant. Abb. D: One-Way ANOVA, Bonferroni-Korrektur, n=3-4, ***p<0,001.

3 Ergebnisse

Die Analyse der Kontrollgene (Abb. 3.10 D) zeigt, dass eine Differenzierung zwischen methylierter und nicht methylierter DNA in allen Gruppen anzunehmen ist. Bei großer Schwankungsbreite der Werte innerhalb der Kontrollgruppe war für die dargestellten Gene des fetalen Genprogramms erneut kein statistisch signifikanter Unterschied zu ermitteln, tendenziell zeigt sich bei aktivierten Genen jedoch eine reduzierte Pulldown-Rate für die Interventionsgruppen im Vergleich zur Kontrolle, was für eine verringerte Methylierung der entsprechenden Promotoren sprechen würde. Nicht unkritisch zu bewerten ist jedoch, dass bei Beurteilung der Kontrollgene (Abb. 3.10 D) eine geringere Pulldown-Rate für den Oxt- und Ube2b-Promotor der AN-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe auffällt, was zunächst biologisch nicht erklärlich erscheint.

3.6 Pulldown mittels MethylCap-Kit für NimbleGen Whole Genome Methylation Array

Nachdem die Methoden zur DNA-Methylierungsanalyse etabliert und optimiert waren und die Einzelpromotoranalysen mittels RT-qPCR erste Ergebnisse zur Methylierung von Promotorbereichen einzelner Gene lieferten, diese Methode in ihrem Umfang aber aus oben genannten Gründen auf wenige Gene beschränkt war, wollten wir in einer aussagekräftigeren Analyse Informationen zum CpG-Methylierungsstatus von Promotorbereichen auf genomweiter Ebene sammeln. Hierzu kombinierten wir unseren Pulldown-Assay mit einem *Whole Genome Methylation Array* der Firma NimbleGen.

3.6.1 Validierung der Methoden

Die Validierung der erfolgreichen Hypertrophieinduktion im EHT erfolgte analog zu den Vorversuchen über Messung des Glukoseverbrauches, visuelle Begutachtung, regelmäßige Erhebung der Kontraktionsparameter, sowie Expressionsanalyse mittels RT-qPCR für die oben genannten Gene des fetalen Genprogramms, bevor die entsprechenden Proben weiter untersucht und zur geplanten Array-basierten Methylierungsanalyse in das Leibniz-Institut für Arterioskleroseforschung (LIFA) nach Münster zur Arbeitsgruppe von Frau Prof. Stoll geschickt wurden.

3.6.1.1 Expressionsanalyse

Nach Extraktion von DNA und RNA aus den EHTs erfolgte erneut die Bestimmung der Expression ausgewählter Gene mittels RT-qPCR (Abb. 3.11). Es zeigte sich erwartungsgemäß eine deutlich stärkere Expression von *Nppa* und *Nppb* in beiden Interventionsgruppen. *Acta1* und *Myh7* waren in der PE-Gruppe nicht signifikant stärker exprimiert (siehe auch Abb. 3.9), wohl aber in der AN-Gruppe. Deutlich zu erkennen ist die verminderte Expression von *Atp2a2* in beiden Interventionsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Wider Erwarten zeigte sich die Expression von *Ube2b* in der AN-Gruppe im Vergleich zu Kontrolle geringer.

3 Ergebnisse

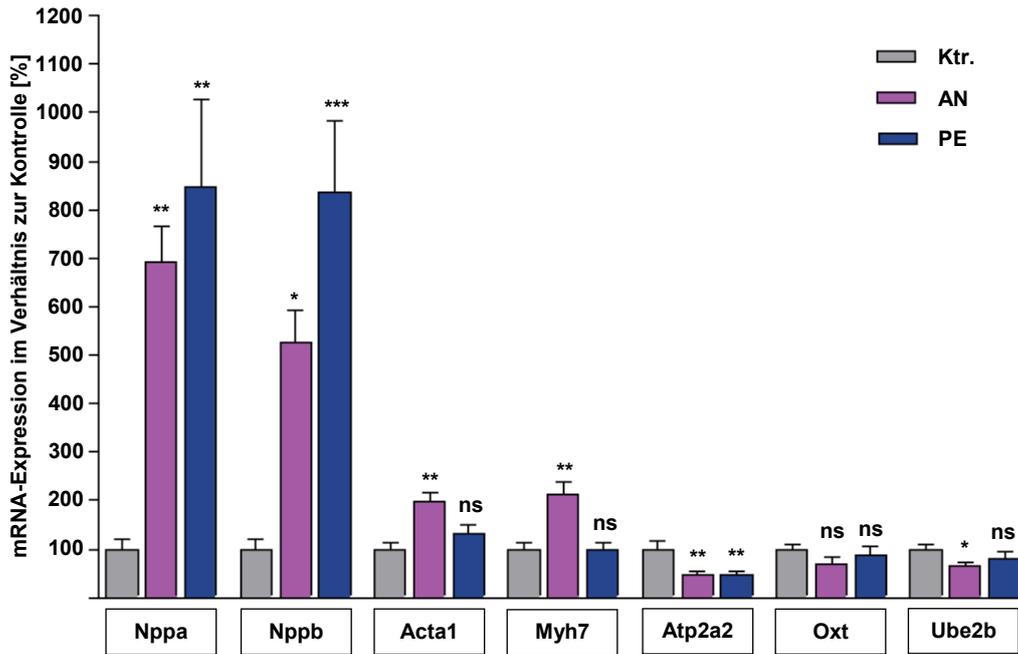


Abb. 3.11: Analyse von Transkripten des fetalen Genprogramms als Qualitätskontrolle für Methylierungs-Array. Dargestellt sind die Expressionsveränderungen ausgewählter Gene des fetalen Genprogrammes, sowie der beiden Kontrollgene Oxt und Ube2b in Form der relativen mRNA-Konzentrationen in % bezogen auf die Kontrollgruppe. Gezeigt ist Mittelwert + SEM, n = 4-6 mit je 3 technischen Replikaten, One-Way ANOVA, Dunnetts Post-Test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

3.6.1.2 Photometrische Qualitätskontrolle der isolierten genomischen DNA

Nach Isolation der DNA aus dem Gesamtgewebe der EHTs erfolgte die Bestimmung der DNA-Konzentration in den einzelnen Proben. Der 260/280-Quotient diente als Maß für die Reinheit der isolierten DNA. Die Messungen bestätigten eine hohe Qualität der zur weiteren Analyse verwendeten Gesamt-DNA.

3 Ergebnisse

Tabelle 3.3: Photometrie der isolierten Gesamt-DNA.

Probe	DNA-Konzentration [ng/ μ l]	A260	A280	260/280
ctr2	29,76	0,595	0,301	1,97
ctr3	30,62	0,612	0,316	1,94
ctr5	23,17	0,463	0,266	1,74
ctr6	36,54	0,731	0,364	2,01
AN1	33,63	0,673	0,333	2,02
AN2	31,12	0,622	0,326	1,91
AN3	32,3	0,646	0,337	1,92
AN4	34,63	0,693	0,35	1,98
AN5	39,55	0,791	0,407	1,94
AN6	32,85	0,657	0,347	1,89
PE1	24,17	0,483	0,258	1,88
PE2	15,91	0,318	0,179	1,78
PE3	24,18	0,484	0,246	1,96
PE4	22,65	0,453	0,243	1,87
PE5	27,36	0,547	0,295	1,86
PE6	24,07	0,481	0,264	1,82

3.6.2 Pulldown und qPCR-Analyse des Methylierungsgrades einzelner Promotorbereiche

Nach ausreichender Validierung der Hypertrophieinduktion durch akute Nachlastserhöhung beziehungsweise pharmakologische Stimulation mit PE wurde die methylierte DNA wie oben beschrieben mit Hilfe des MethylCap-Kits angereichert und anschließend der Methylierungsgrad per qPCR für einzelne Promotoren quantifiziert. Wie in den Vorversuchen ließ sich ein signifikanter Unterschied in der Pulldown-Rate für die Kontrollgene *Oxt* und *Ube2b* innerhalb der einzelnen Gruppen bestätigen, sodass wir erneut von einer hinreichenden Differenzierung zwischen methylierter und nicht methylierter DNA mit Hilfe dieser Methode ausgehen konnten. Für die weiteren Promotoren ergab sich wiederum kein statistisch signifikanter Unterschied, aber ein Trend zu niedrigerer Methylierung der untersuchten Sequenz aus dem Promotorbereich des in den Interventionsgruppen aktivierten Gens *Nppa*. In diesem Fall wurden lediglich die Kontrollen *Oxt* und *Ube2b* sowie der *Nppa*-

3 Ergebnisse

und Nppb-Promotor untersucht, um für die folgende Array-basierte Analyse noch eine ausreichende Menge an DNA zur Verfügung zu haben.

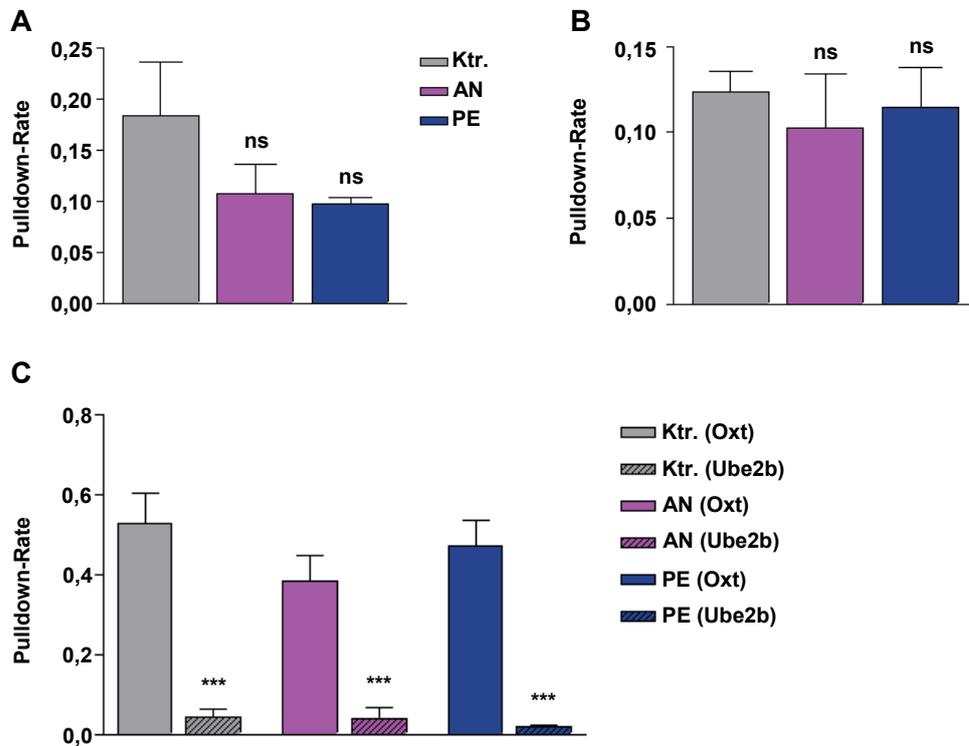


Abb. 3.12: Pulldown-Rate methylierter DNA-Fragmente im Verhältnis zur eingesetzten DNA. A: Pulldown-Rate für Nppa-Promotor, B: Pulldown-Rate für Nppb-Promotor, C: Pulldown-Rate für Oxt- und Ube2b-Promotor als Beispiel einer nahezu vollständig methylierten, bzw. unmethylierten Promotorregion. Abb. A + B Gezeigt ist Mittelwert + SEM, n = 4-6 mit je 3 technischen Replikaten, One-Way ANOVA, Dunnetts Post-Test. ns = nicht signifikant. Abb. C: One-Way ANOVA, Bonferroni-Korrektur, n = 4-6, ***p<0,0001.

3.6.3 Einzelpromotorplots der NimbleGen Whole Genome Methylation Array-Analyse

Die Verarbeitung der Rohdaten der Array-Analyse erfolgte wie in Kapitel 2.5.6 beschrieben. Für die Darstellung des Methylierungsstatus der Promotorbereiche wurden die über die Replikate in einer Gruppe gemittelten Signalintensitäten der einzelnen Sonden (*Probes*) im Verhältnis zur durchschnittlichen Pulldown-Rate aller Sonden in allen Gruppen abgebildet, die Pulldown-Rate ergibt sich jeweils aus dem Verhältnis der hybridisierten angereicherten DNA (Pulldown) zur Gesamt-DNA (*Input*) einer Probe. Es wurde jeweils ein Abschnitt von maximal 4847 Basenpaaren vor bis maximal 968 Basenpaaren nach dem Transkriptionsstart des jeweiligen Gens durch Sonden mit einer Länge von 50 Basenpaaren mit einem Abstand von je 100 Basenpaaren abgedeckt (siehe auch Kapitel 2.7.3 im Abschnitt Methoden). Durch die Auswahl dieses Abschnittes sollte ein für den jeweiligen Promotor möglichst repräsentativer Bereich gegebenenfalls unter Einschluss von CpG-Inseln abgebildet werden. Differenziell methylierte Regionen wurden mit dem Signifikanzniveau für die jeweiligen

3 Ergebnisse

Probes markiert, welches in den Abbildungen als negativer dekadischer Logarithmus des für multiples Testen adjustierten p-Wertes dargestellt ist. Beispielsweise finden sich im abgebildeten Bereich des *Nppa*-Gens (Abbildung 3.13) kurz nach dem Transkriptionsstart zwei für die Gruppe der akuten Nachlasterhöhung und die Phenylephrin-behandelte Gruppe gleichermaßen signifikante Bereiche differenzieller Methylierung. Innerhalb des abgebildeten Promotorbereiches ließ sich jedoch, im Widerspruch zu den erhobenen Daten der Einzelpromotoranalysen, kein Unterschied in der Methylierungsrate zwischen Kontroll- und Interventionsgruppen finden. Insbesondere im Bereich von circa 1000 Basenpaaren vor dem Transkriptionsstart lässt sich jedoch erkennen, dass sich die beiden Interventionsgruppen in ihrem Signalverhalten tendenziell ähneln und von der Kontrollgruppe abweichen.

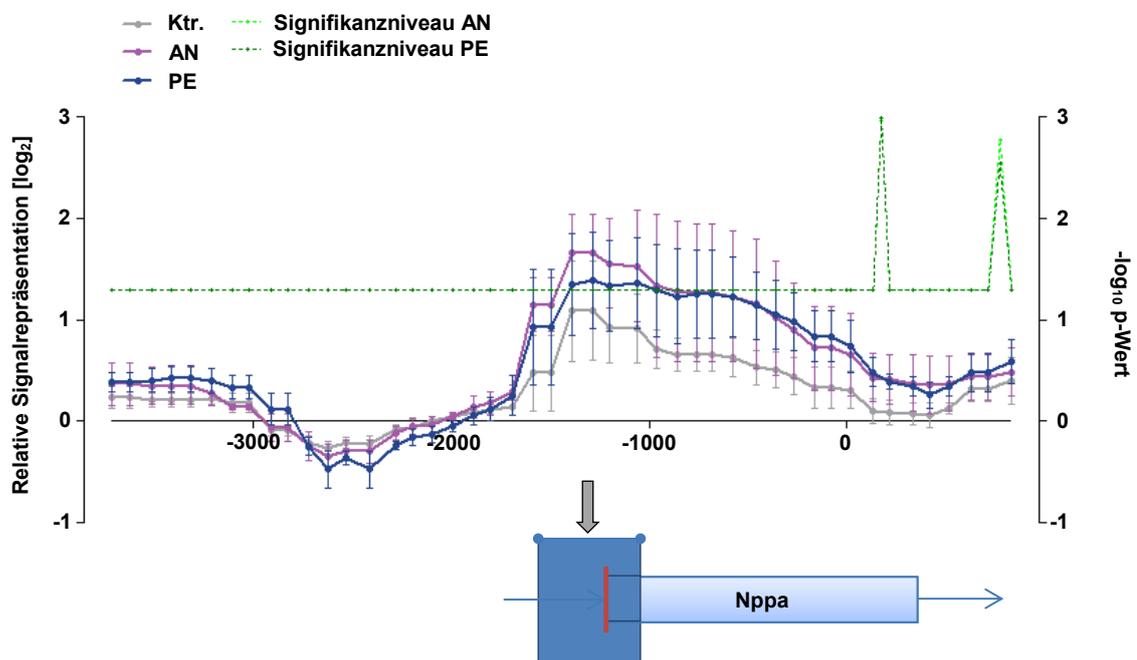


Abb. 3.13: DNA-Methylierung im Bereich des Transkriptionsstarts von *Nppa*. Gezeigt ist die Über-, beziehungsweise Unterrepräsentation des Sondenbindungssignals für die einzelnen Gruppen im Bereich des *Nppa*-Promotors. Die Werte sind normalisiert auf eine genomweite durchschnittliche Signalrepräsentation. Die X-Achse bezeichnet die Basenposition vom Transkriptionsstartpunkt ausgehend. Auf der rechten Y-Achse ist das Signifikanzniveau als negativer dekadischer Logarithmus des p-Wertes für die beiden Interventionsgruppen (akute Nachlasterhöhung [violett], Phenylephrin [blau]) im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Ein für multiples Testen adjustierter p-Wert < 0,05 wurde als signifikant erachtet.

Für den dargestellten Bereich um den Transkriptionsstart des *Nppb*-Gens (Abbildung 3.14) finden sich wiederum zwei differenziell methylierte Bereiche. Etwa 2700 Basenpaare *upstream* des Transkriptionsstarts zeigt sich lediglich für die Phenylephringruppe ein Bereich mit einer verhältnismäßig höheren Methylierungsrate. Unmittelbar nach dem Transkriptionsstart findet sich ein weiterer Bereich mit signifikantem Unterschied in beiden Interventionsgruppen bei geringerer Methylierungsrate im Vergleich zur Kontrolle, passend zu den in vorhergehenden Versuchen durchgeführten qPCR-Analysen der Pulldown-DNA.

3 Ergebnisse

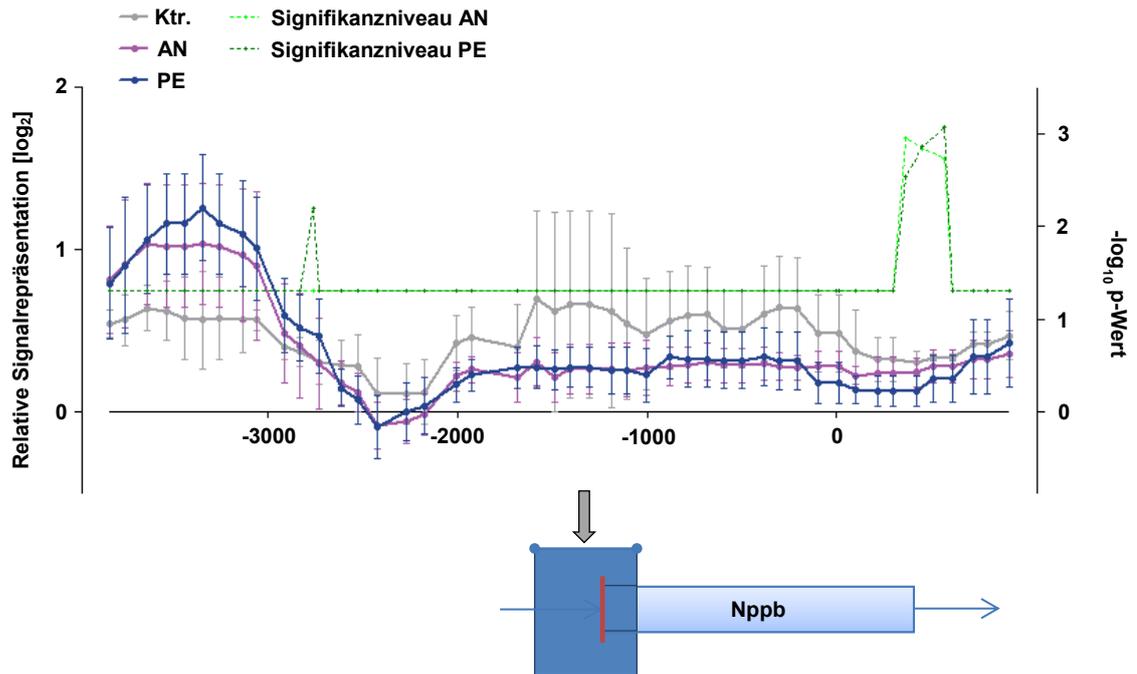


Abb. 3.14: DNA-Methylierung im Bereich des Transkriptionsstarts von Nppb. Darstellung des Sondenbindungssignals, analog zu Abbildung 3.13, für die einzelnen Interventionsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe innerhalb des ausgewählten Bereiches um den Transkriptionsstart des Nppb-Gens.

Abbildung 3.15 bildet die relative Methylierungsrate im Bereich des Transkriptionsstarts des Acta1-Gens ab. Hier zeigte sich ebenfalls ein gleichförmiges Verhalten für die Methylierungsrate der beiden Interventionsgruppen. Während die Einzelpromotoranalysen bereits tendenziell eine geringere Pulldown-Rate für Acta1 erkennen ließ, zeigte die Analyse mittels *Microarray* wiederum in zwei statistisch signifikanten Bereichen eine relative Hypomethylierung in den Interventionsgruppen.

3 Ergebnisse

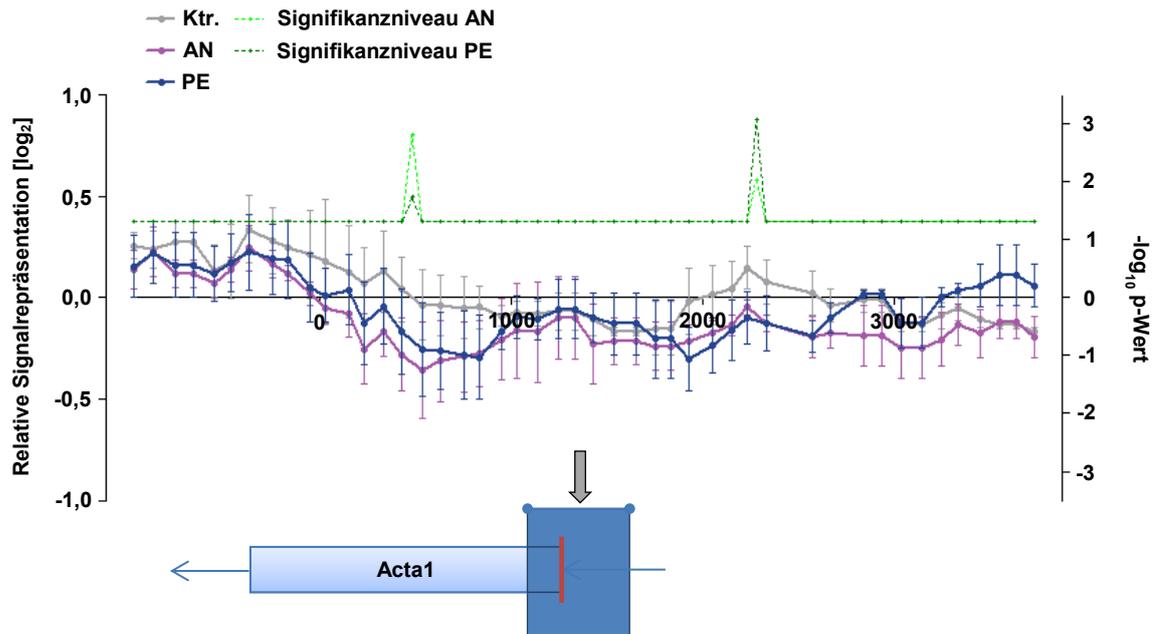


Abb. 3.15: DNA-Methylierung im Bereich des Transkriptionsstarts von Acta1. Darstellung des Sondenbindungssignals, analog zu Abbildung 3.13, für die einzelnen Interventionsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe innerhalb des ausgewählten Bereiches um den Transkriptionsstart des Acta1-Gens.

Zusätzlich zu den oben beschrieben und bereits im Rahmen der Einzelpromotoranalysen untersuchten Gene des fetalen Genprogrammes sollte der Methylierungsstatus im Promotorbereich weiterer ausgewählte Marker der kardialen Hypertrophie und Fibrose untersucht werden.

Abbildung 3.16 zeigt den Promotorbereich des Myh6-Gens. Es zeigte sich innerhalb des untersuchten DNA-Abschnittes ein Bereich relativer Hypomethylierung für beide Interventionsgruppen bei ca. 1300 Basenpaaren *upstream* des Transkriptionsstartes, weiterhin zeigt sich in der PE-Gruppe ein hypermethylierter Bereich bei ca. 2700 Basenpaaren *upstream* des Transkriptionsstartes. Nach Hypertrophie-assoziiertem Isoformenwechsel mit Prädominanz von β -MHC (Myh7) und supprimiertem α -MHC (Myh6-Gen) wäre anzunehmen gewesen, dass sich innerhalb des Promotorbereiches von Myh6 in den Interventionsgruppen ein vermehrter Gehalt methylierter Cytosine zu finden sein würde.

3 Ergebnisse

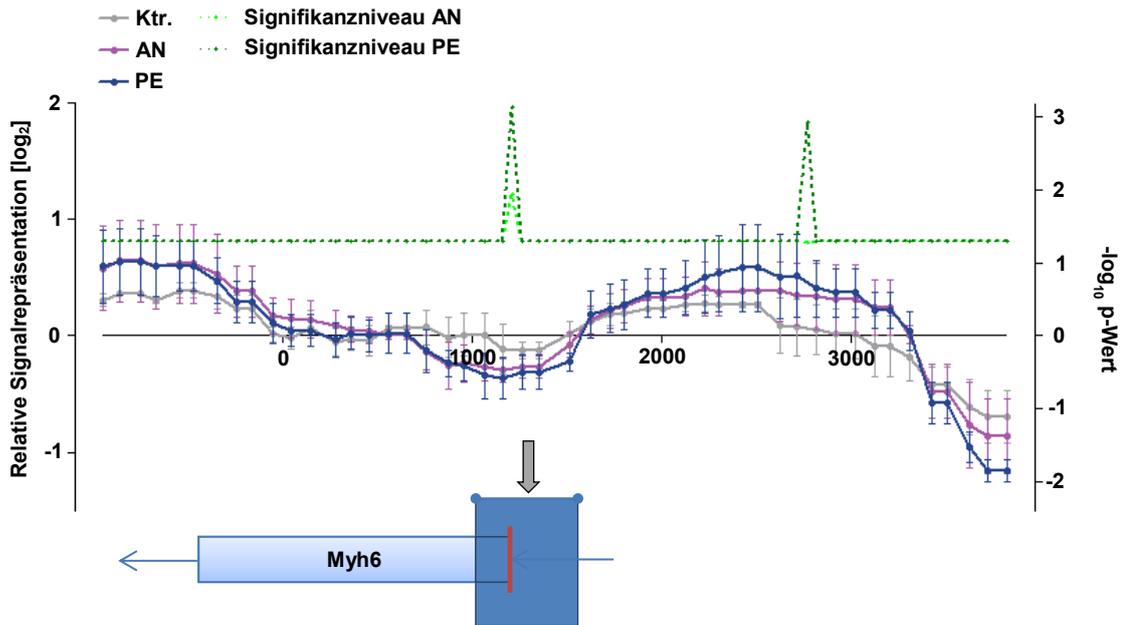


Abb. 3.16: DNA-Methylierung im Bereich des Transkriptionsstarts von Myh6. Darstellung des Sondenbindungssignals, analog zu Abbildung 3.13, für die einzelnen Interventionsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe innerhalb des ausgewählten Bereiches um den Transkriptionsstart des Myh6-Gens.

Im Fall von Myh7 konnten korrespondierende Daten zur mRNA erhoben werden (siehe Abbildung 3.11). Nach einem Hypertrophie-assoziierten Isoformenwechsel mit erhöhter Expression von β -MHC in den Interventionsgruppen erwarteten wir für den Myh7-Promotor eine entsprechend verminderte DNA-Methylierung innerhalb des Promotorbereiches. Wie die Abbildung 3.17 zeigt, findet sich im Gegensatz hierzu ein Bereich verhältnismäßig erhöhter Methylierung in beiden Interventionsgruppen im Bereich von circa 300-600 Basenpaaren *upstream* des Transkriptionsstartes.

In den Transkriptionsanalysen aus Nachlast-verstärktem EHT konnte wiederholt eine verminderte Expression des Atp2a2-Gens (Serca2a) in den Interventionsgruppen gezeigt werden. Diese korrelierte mit einer erhöhten Methylierungsrate im Promotorbereich für beide Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Abbildung 3.18 zeigt eine signifikant stärker methylierte Region um circa 2800 Basenpaare *upstream* des Transkriptionsstartpunktes. Zudem findet sich kurz nach dem Transkriptionsstartpunkt ein kleinerer Bereich vermindelter DNA-Methylierung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

3 Ergebnisse

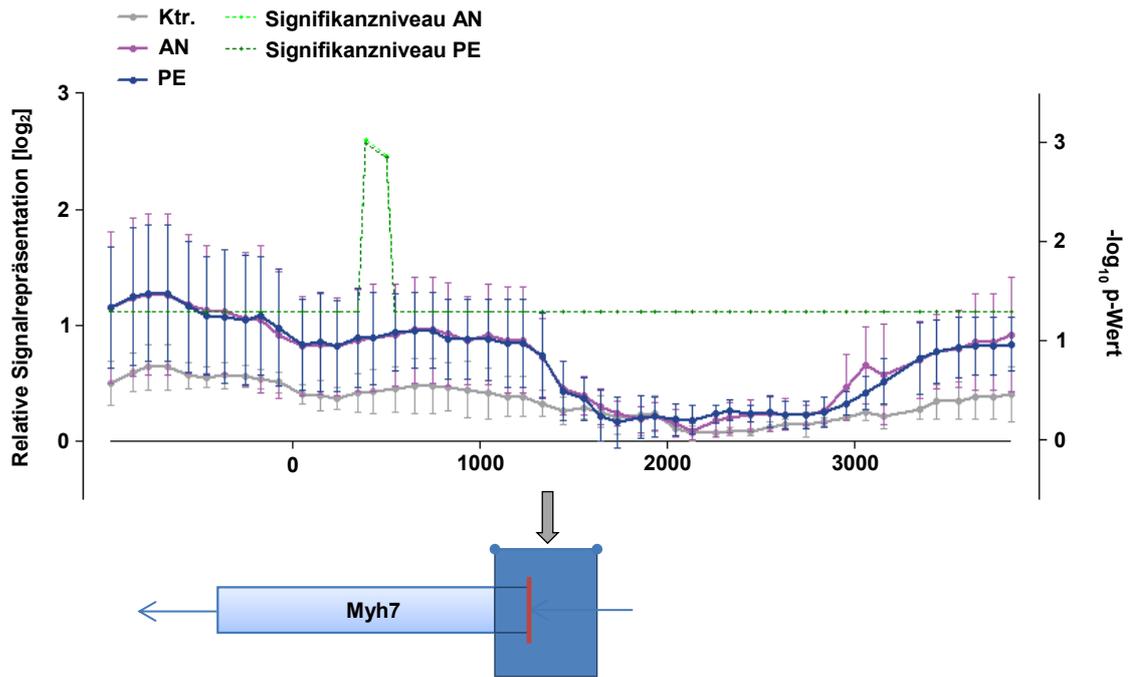


Abb. 3.17: DNA-Methylierung im Bereich des Transkriptionsstarts von Myh7. Darstellung des Sondenbindungssignals, analog zu Abbildung 3.13, für die einzelnen Interventionsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe innerhalb des ausgewählten Bereiches um den Transkriptionsstart des Myh7-Gens.

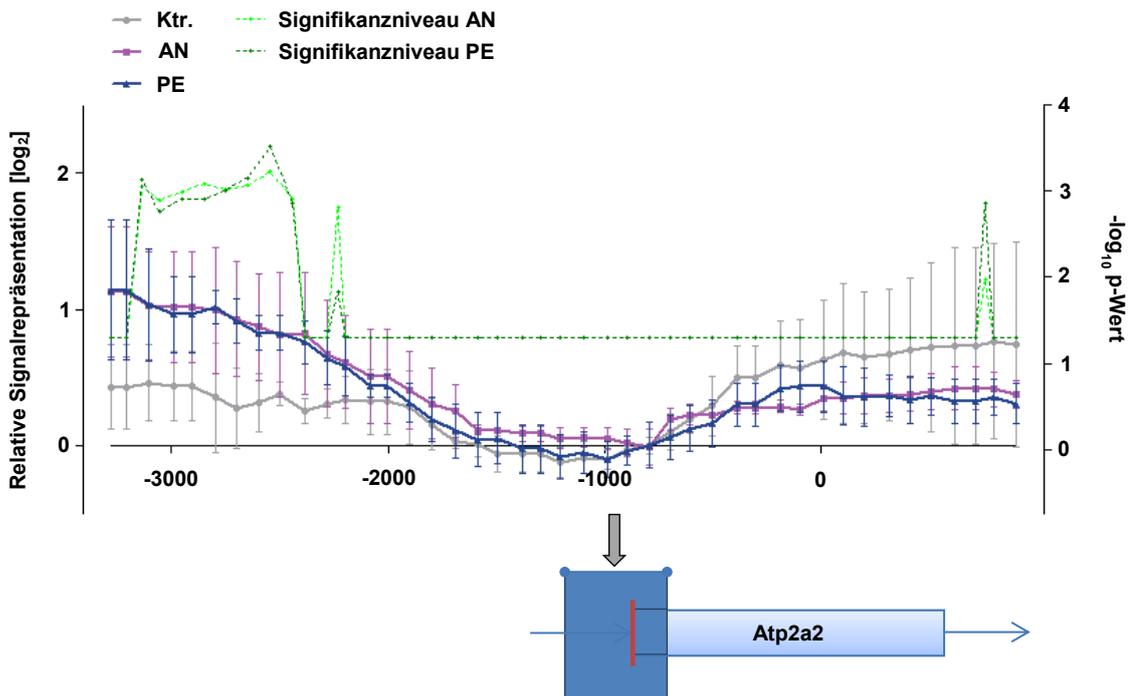


Abb. 3.18: DNA-Methylierung im Bereich des Transkriptionsstarts von Atp2a2. Darstellung des Sondenbindungssignals, analog zu Abbildung 3.13, für die einzelnen Interventionsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe innerhalb des ausgewählten Bereiches um den Transkriptionsstart des Atp2a2-Gens.

Weiterhin untersuchten wir die Promotorbereiche der Kontrollgene Oxt (Oxytocin, Positivkontrolle) und Ube2b (Ubiquitin-conjugating Enzyme E2b, Negativkontrolle). In den

3 Ergebnisse

Einzelpromotoruntersuchungen zeigten, dass der Oxt-Promotor erwartungsgemäß sehr stark und der Ube2b-Promotor sehr wenig methyliert war. Bezüglich der Methylierungsbeziehungswise der Pulldown-Rate ließen sich zudem keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen nachweisen. Die Untersuchung mittels *Microarray* zeigte einen umschriebenen Bereich circa 3000 Basenpaare *upstream* des Oxt-Promotors mit geringerer Methylierungsrate für die AN- und PE-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3.19).

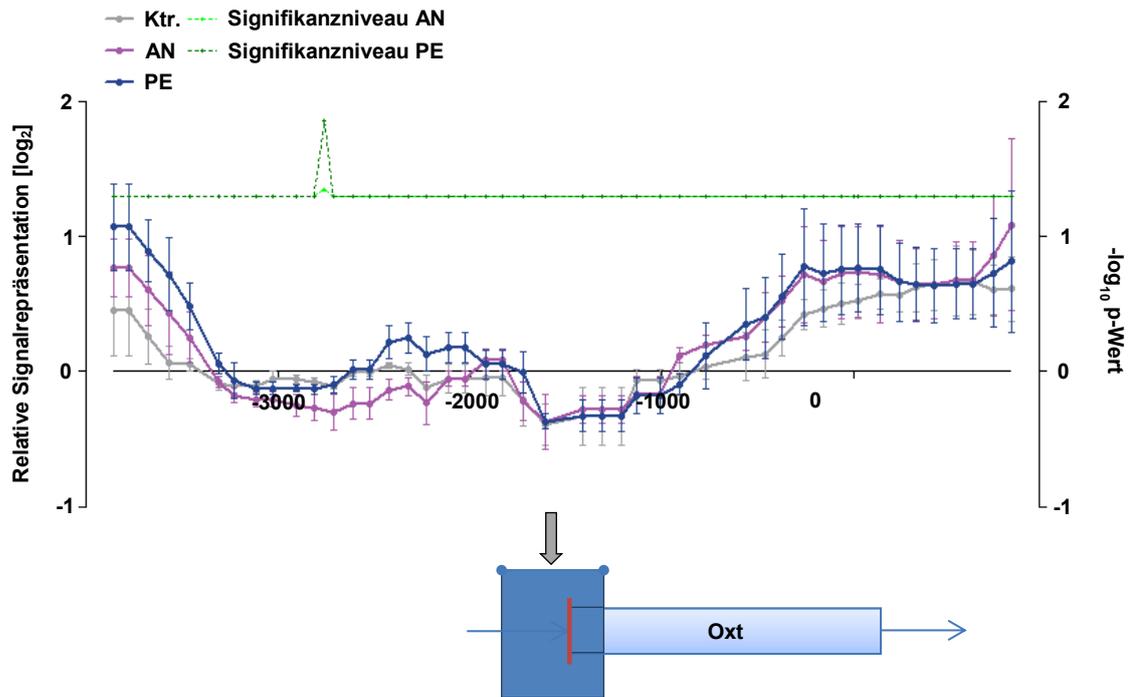


Abb. 3.19: DNA-Methylierung im Bereich des Transkriptionsstarts von Oxt. Darstellung des Sondenbindungssignals, analog zu Abbildung 3.13, für die einzelnen Interventionsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe innerhalb des ausgewählten Bereiches um den Transkriptionsstart des Oxt-Gens.

Auch im Bereich des Ube2b-Promotors (Abbildung 3.20) fand sich wiederum ein Bereich verminderter DNA-Methylierung in der AN- und PE-Gruppe unmittelbar vor dem Transkriptionsstart, sowie ein weiterer Bereich signifikant erhöhter Methylierung 1000 Basenpaare *upstream* des Transkriptionsstartpunktes.

3 Ergebnisse

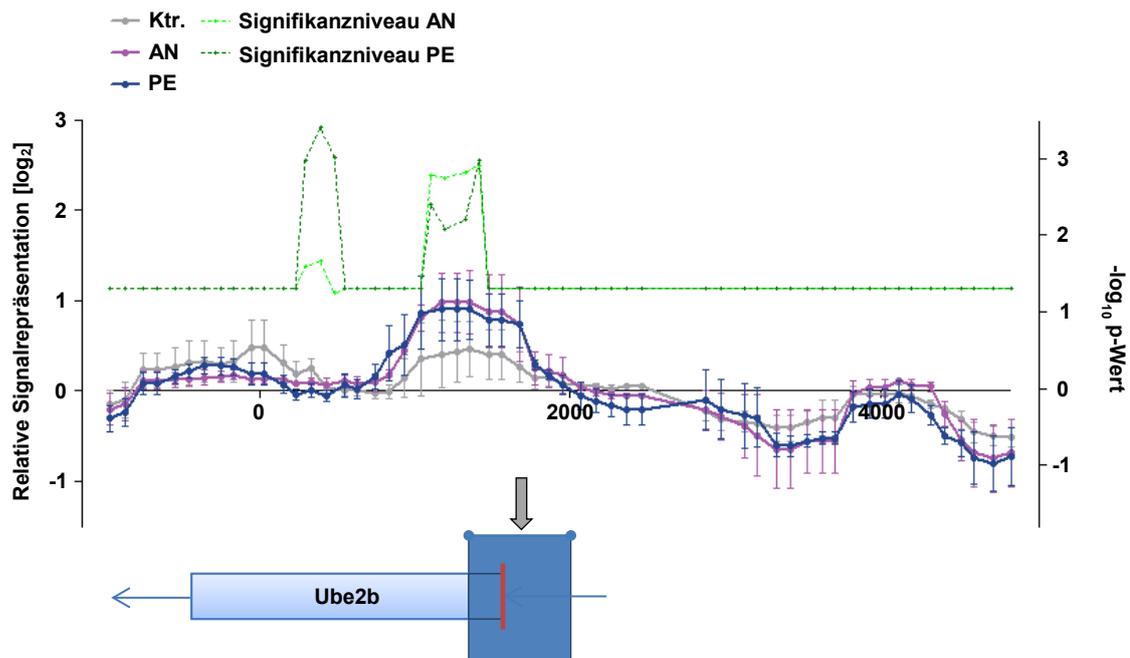


Abb. 3.20: DNA-Methylierung im Bereich des Transkriptionsstarts von Ube2b. Darstellung des Sondenbindungssignals, analog zu Abbildung 3.13, für die einzelnen Interventionsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe innerhalb des ausgewählten Bereiches um den Transkriptionsstart des Ube2b-Gens.

Ein Kollagenmolekül besteht aus je drei linksgängigen Peptidketten (zwei α 1-Ketten, eine α 2-Kette), welche als rechtsgängige Tripelhelix umeinander gewunden sind. Die einzelnen Kollagenmoleküle sind wiederum zu Fibrillen zusammen gelagert und werden über kovalente Quervernetzung fixiert. Es gibt verschiedene Kollagentypen, die fibrillären Kollagene vom Typ I und Typ III stellen die im Herzen prädominanten Isoformen dar. Das Gen Col1a1 kodiert für die alpha1-Kette des Kollagen Typ I, Col3a1 kodiert für die alpha1-Kette des Kollagen Typ III. In vorangegangenen Versuchen konnten Hirt et al. für Col1a1, welches für die Fibrose im Herzgewebe eine vorrangige Rolle spielt, eine vermehrte Expression in EHTs nach akuter Nachlasterhöhung beziehungsweise pharmakologischer Stimulation zeigen, weshalb die DNA-Methylierung der Promotorbereiche beider oben genannter Gene für Kontrollen und Interventionsgruppen aus den Array-Daten bestimmt werden sollte.

3 Ergebnisse

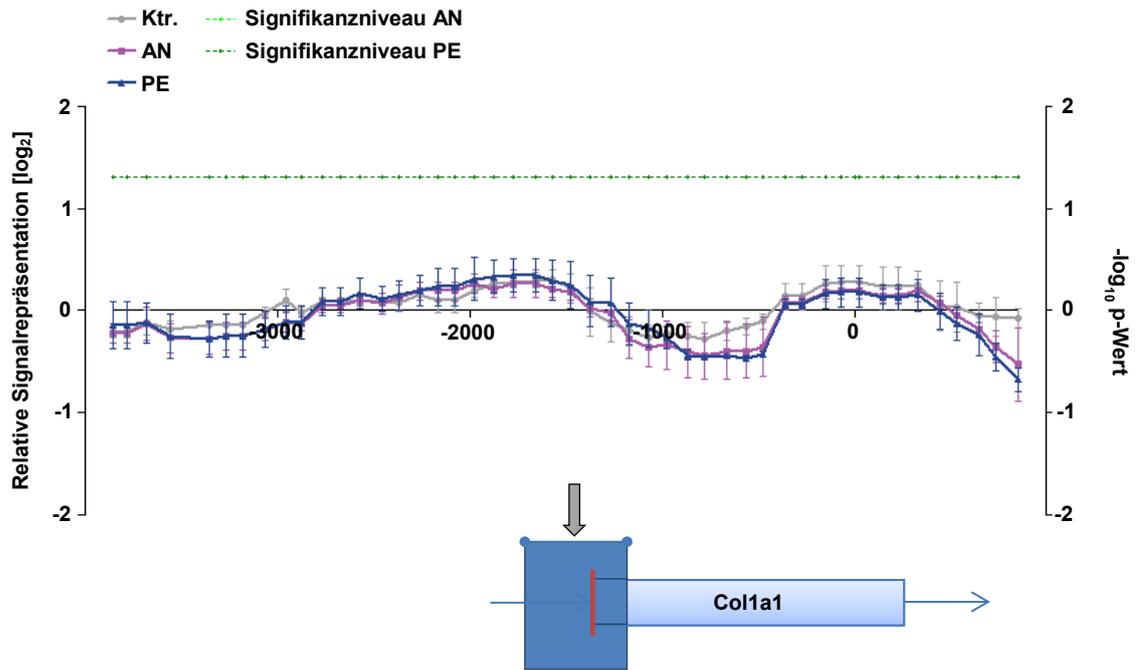


Abb. 3.21: DNA-Methylierung im Bereich des Transkriptionsstarts von Col1a1. Darstellung des Sondenbindungssignals, analog zu Abbildung 3.13, für die einzelnen Interventionsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe innerhalb des ausgewählten Bereiches um den Transkriptionsstart des Col1a1-Gens.

Abbildung 3.21 zeigt keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen für Col1a1, ebenso verhält es sich für Col3a1 (Abbildung 3.22).

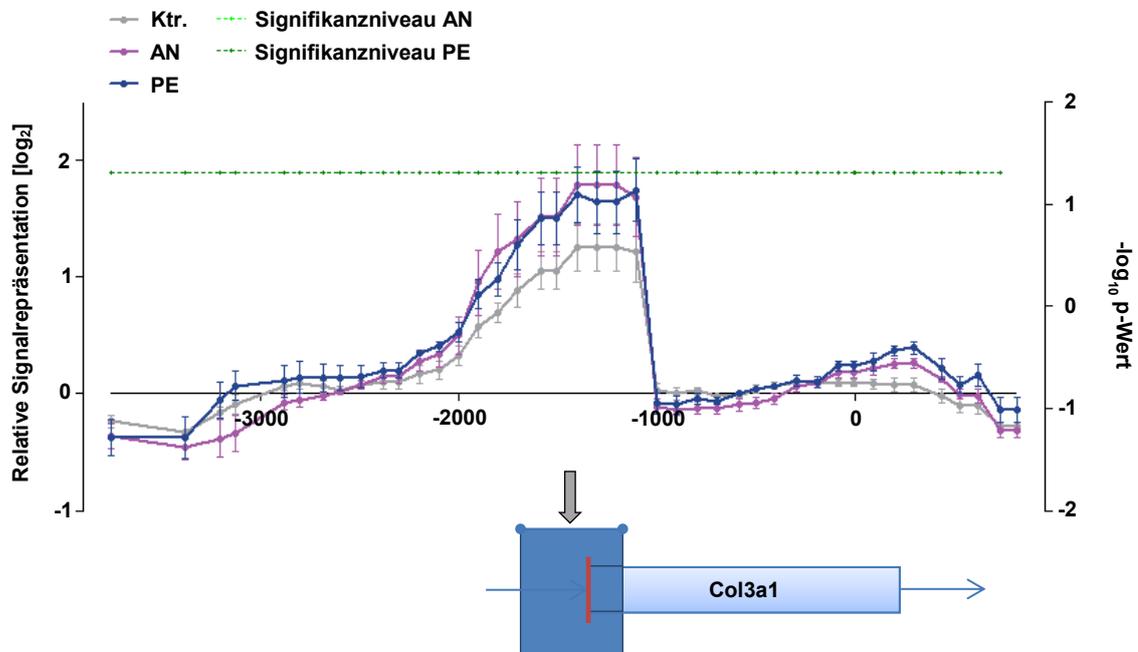


Abb. 3.22: DNA-Methylierung im Bereich des Transkriptionsstarts von Col3a1. Darstellung des Sondenbindungssignals, analog zu Abbildung 3.13, für die einzelnen Interventionsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe innerhalb des ausgewählten Bereiches um den Transkriptionsstart des Col3a1-Gens.

3 Ergebnisse

Connective tissue growth factor (CTGF) gehört zu einer Gruppe sogenannter matrizellulärer Proteine (CNN-Gruppe). Der Wachstumsfaktor CTGF übt Einfluss auf die Regulation zahlreicher biologischer Prozesse aus. Von besonderer Bedeutung ist in diesem Fall die Induktion von Fibrose in Zusammenspiel mit dem Zytokin *Transforming Growth Factor β* (TGF- β) bei Überexpression von *Ctgf* in Fibroblasten. Auch hierfür konnte in den EHTs der AN- beziehungsweise PE-Gruppe eine vermehrte Expression festgestellt werden, während die Promotoranalyse eine differenziell methylierte Region innerhalb des *Ctgf*-Promotors zeigte (Abb. 3.23). Der dargestellte Bereich zeigte jedoch eine vermehrte Methylierung für beide Interventionsgruppen im Vergleich zur Kontrolle.

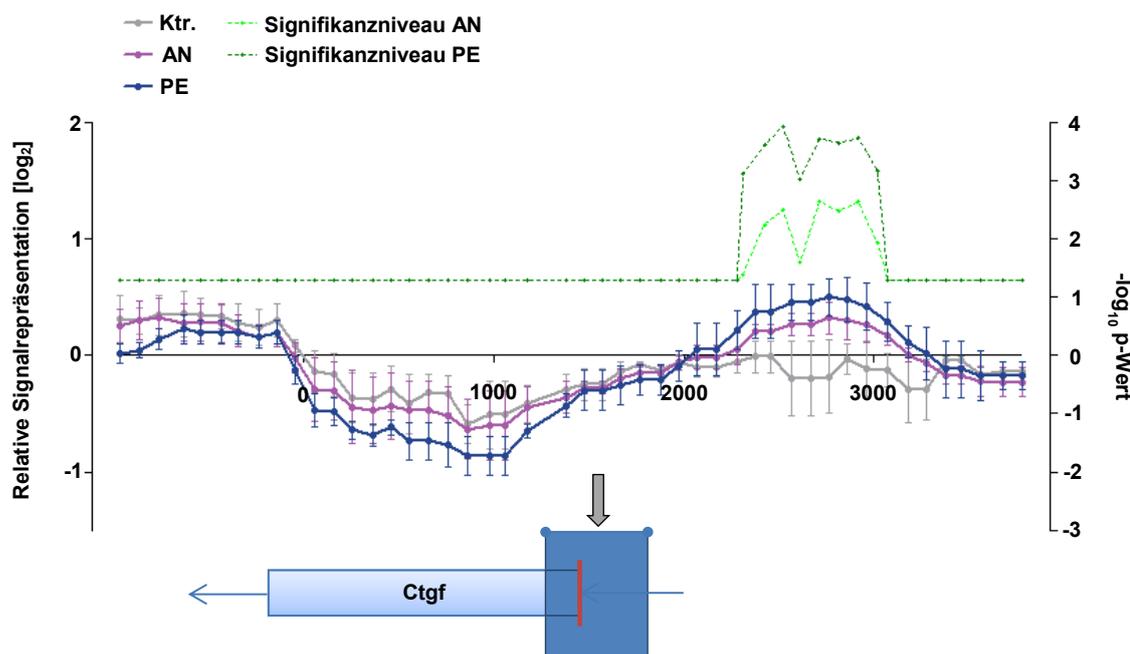


Abb. 3.23: DNA-Methylierung im Bereich des Transkriptionsstarts von *Ctgf*. Darstellung des Sondenbindungssignals, analog zu Abbildung 3.13, für die einzelnen Interventionsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe innerhalb des ausgewählten Bereiches um den Transkriptionsstart des *Ctgf*-Gens.

In den Transkriptionsanalysen wurden die Ct-Werte für die einzelnen Transkripte auf *Gusb* normalisiert. Das Gen *Gusb* kodiert für eine β -Glucuronidase welche in Kardiomyozyten nicht differenziell reguliert wird. Erwartungsgemäß fand sich in der Promotoranalyse keine Region mit differenzieller Methylierung, wie Abbildung 3.24 zeigt.

3 Ergebnisse

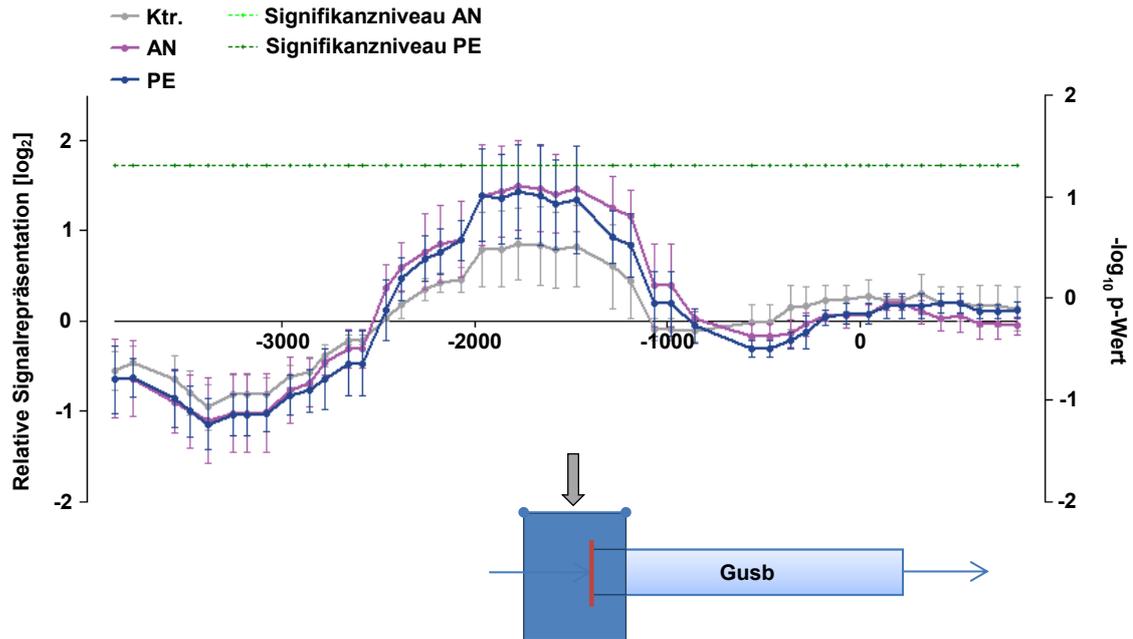


Abb. 3.24: DNA-Methylierung im Bereich des Transkriptionsstarts von Gusb. Darstellung des Sondenbindungssignals, analog zu Abbildung 3.13, für die einzelnen Interventionsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe innerhalb des ausgewählten Bereiches um den Transkriptionsstart des Gusb-Gens.

3.6.4 Clusteranalyse

Eine Clusteranalyse der 30 signifikantesten differenziell methylierten *Probes* wurde vom LIFA in Münster aus den Daten der Microarray-Analyse erstellt. Es ist zu erkennen, dass einerseits eine hohe Übereinstimmung für die biologischen Replikate innerhalb der einzelnen Gruppen besteht, andererseits die AE- und die PE-Gruppe, wie schon in den Einzelpromotorplots in Kapitel 3.6.3 zu erkennen, *clustern*. Dieses spricht für ein gemeinsames Methylierungsmuster nach Hypertrophieinduktion, welches sich von dem der Kontrollgruppe eindeutig unterscheidet.

3 Ergebnisse

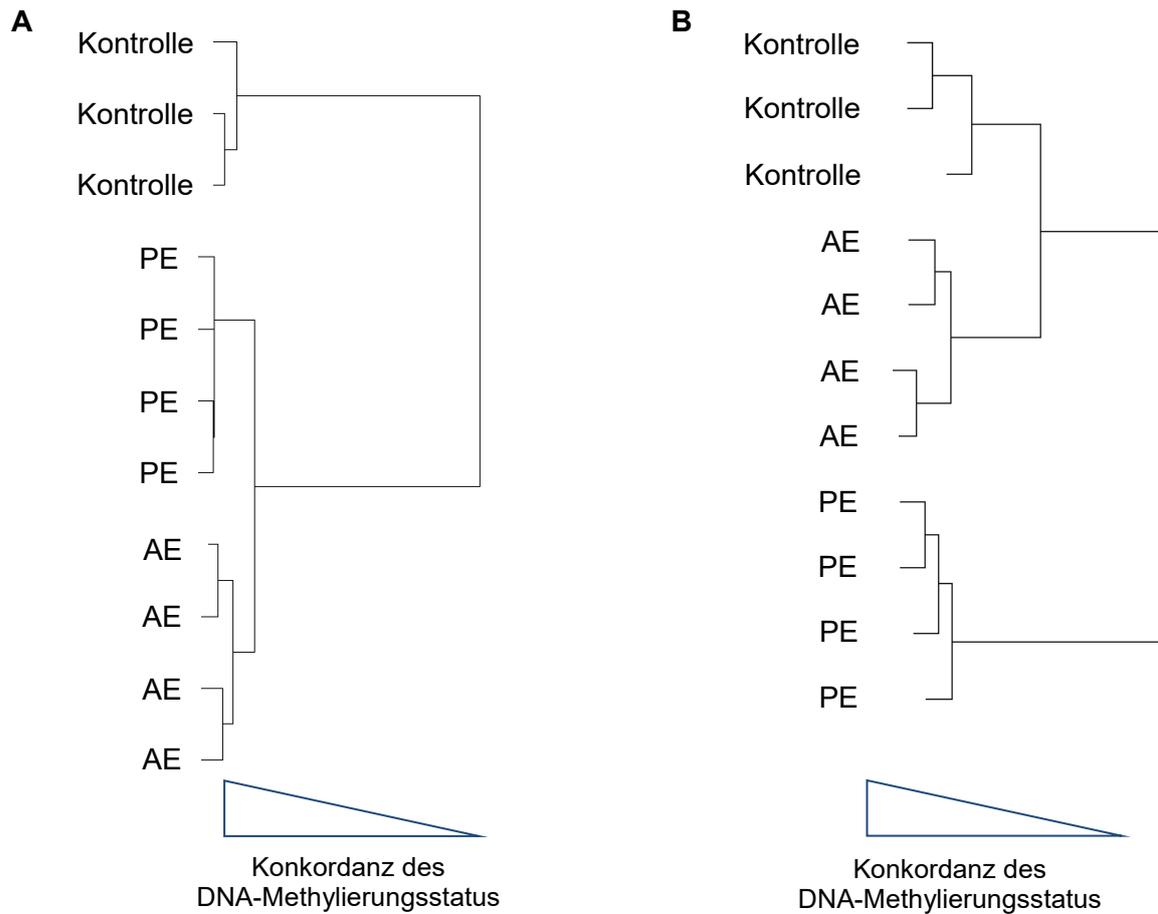


Abb. 3.25: NimbleGen Whole Genome Methylation Array Clusteranalyse. Dargestellt ist der Grad an Übereinstimmung für die (A) 30 am signifikantesten differenziell methylierten, beziehungsweise (B) 1000 am signifikantesten differenziell methylierten *Probes*. Analyse mittels DEVA- (NimbleGen) sowie R-Software (Bioconductor-Paket, R Development Core Team).

3.7 Erste Versuche der Beeinflussung mittels methylierender und demethylierender Substanzen

In den letzten Jahren haben sich verschiedene Arbeitsgruppen mit potentiell die DNA-Methylierung induzierenden beziehungsweise DNA-Methylierung inhibierenden Substanzen und derartiger Wirkungen bereits etablierter Arzneistoffe beschäftigt. Basierend auf einer Auswahl verschiedener Studien, welche in der Diskussion weiter erörtert werden, untersuchten wir exemplarisch den Einfluss verschiedener Substanzen mit bereits beschriebenem epigenetischem Wirkspektrum. Hierfür wählten wir die bereits zur Behandlung verschiedener hämatoonkologischer Erkrankungen zugelassene Substanz 5-Aza-2'-deoxycytidin (5-Aza-dC, Decitabin) als nukleosidischen DNA-Methyltransferase-Inhibitor, das vasodilatierende Antihypertensivum Hydralazin (HL) als nichtnukleosidischen DNMT-Inhibitor, sowie Trichlorethylen (TCE) als potentiell hypermethylierende Substanz aus. Ein erstes Arbeitsziel bei der Behandlung von EHT mit Substanzen mit Wirkung auf die DNA-Methylierung war es, beschriebene Effekte auf Transkription und Methylierung im EHT-Modell mit der nun etablierten Methode zur Untersuchung des Promotor-Methylierungsstatus zu reproduzieren.

3.7.1 Videooptische Bestimmung funktioneller Parameter

Es erfolgte die videooptische Messung der Kontraktilität für alle Interventionsgruppen an Tag 22 der Zellkultur in serumfreiem Zellkulturmedium nach insgesamt 72 Stunden Inkubation in Hydralazin, beziehungsweise 5-Aza-dC und 3,5 Stunden Inkubation mit TCE in zwei verschiedenen Konzentrationen. Ein signifikanter Effekt zeigte sich lediglich in Bezug auf die Schlagkraft für die Hydralazin-Gruppe (Abbildung 3.27 A). Die Schlagfrequenz schien für die Hydralazin-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe etwas höher zu sein (Abbildung 3.27 B). Bei hoher Standardabweichung in der Kontrollgruppe war dieser Effekt nicht statistisch signifikant. Für die Kontraktions- und Relaxationszeiten ließ sich jeweils kein Unterschied feststellen.

3 Ergebnisse

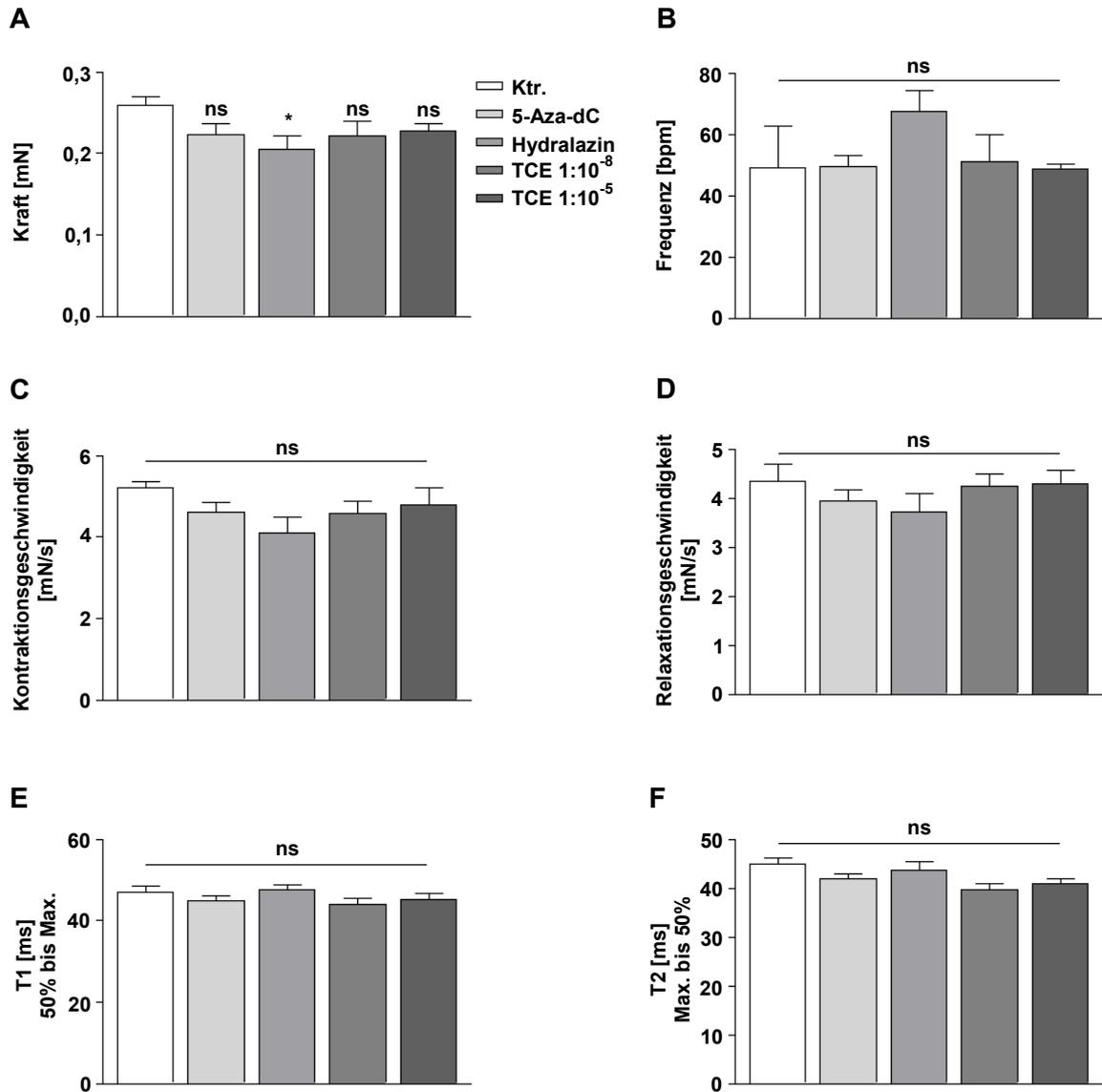


Abb. 3.26: Kontraktilität von EHT nach Behandlung mit DNA-Methylierungs-Inhibitoren und -Induktoren. Dargestellt sind die Kontraktionsparameter für die verschiedenen Interventionsgruppen am Tag 22 der Zellkultur nach 72-stündiger Inkubation in Hydralazin (30 μ M), beziehungsweise 5-Aza-2'-deoxycytidin (30 μ M) und 3,5-stündiger Inkubation mit Trichlorethylen im Vergleich zur Kontrollgruppe. A Kraft in mN. B Frequenz in bpm. C Kontraktionsgeschwindigkeit in mN/s. D Relaxationsgeschwindigkeit in mN/s. E Kontraktionszeit von 50% der maximalen Kraft bis zur maximalen Kontraktion (T1). F Relaxationszeit von maximaler Kontraktion zu 50% der maximalen Kraft (T2). Gezeigt ist der Mittelwert + SEM, n = 4-11, One-Way ANOVA, Dunnetts Post-Test. ns = nicht signifikant, * $p < 0,05$.

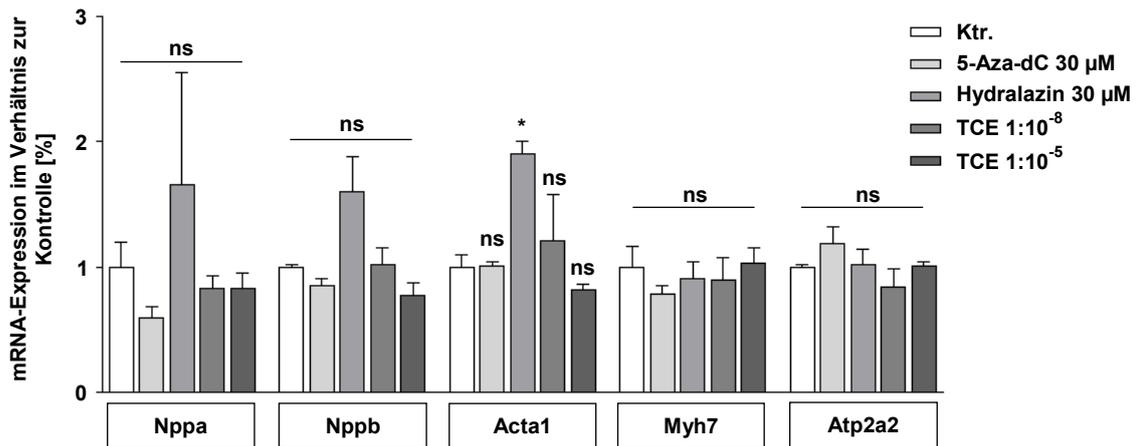
3.7.2 Expressionsanalysen

Nach Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen nach oben beschriebenem Protokoll (Kap. 2.6.7) wurden die EHTs geerntet und analog zu den Vorversuchen jeweils aus zwei zusammengelegten EHTs parallel DNA und RNA isoliert. Die Transkription einzelner Marker-Gene wurde mittels RT-qPCR quantifiziert. Insgesamt zeigte sich kein relevanter Unterschied in der Transkription der dargestellten Gene zwischen den

3 Ergebnisse

verschiedenen Interventionsgruppen sowie im Vergleich zu den Kontroll-EHTs. Lediglich bei Behandlung mit Hydralazin zeigte sich in einem Versuch für die Expression von Acta1 ein signifikanter Unterschied (Abb. 3.27 A), dieser ließ sich jedoch auch im Folgeversuch nicht reproduzieren. Hierfür sind verschiedene Erklärungen denkbar, welche unten weiter erörtert werden. Zu diesem Zeitpunkt verzichteten wir aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche zunächst auf weitere Analysen der DNA.

A



B

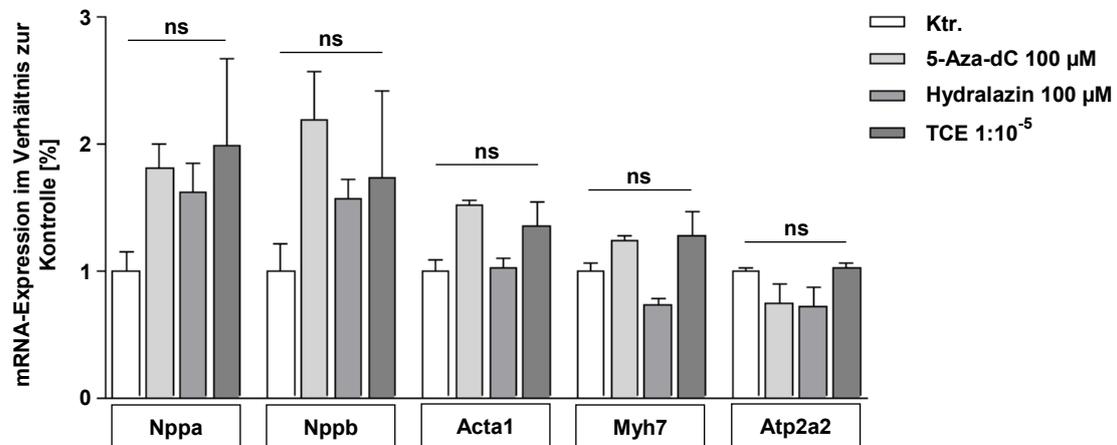


Abb. 3.27: Analyse von Transkripten des fetalen Genprogramms nach Exposition der EHT gegenüber demethylierenden/methylierenden Substanzen. Dargestellt sind die Expressionsveränderungen ausgewählter Gene des fetalen Genprogrammes in Form der relativen mRNA-Konzentrationen in % bezogen auf die Kontrollgruppe. A Inkubation von EHT mit 5-Aza-2'-deoxycytidin, Hydralazin (je 30 µM über 72 Stunden vor Ernte) und TCE (1:10⁻⁸, bzw. 1:10⁻⁵ für je 3,5 Stunden). B 5-Aza-dC und HL (je 100 µM) TCE (1:10⁻⁵) über je ca. 87 Stunden. Gezeigt ist der Mittelwert + SEM, n = 3 (Abb. A n = 2 für Ktr. und TCE) mit je 3 technischen Replikaten, One-Way ANOVA, Dunnetts Post-Test, *p<0,05.

4 DISKUSSION

4.1 Das *in vitro*-Modell der kardialen Hypertrophie ist zur Untersuchung epigenetischer Mechanismen geeignet.

Eine wesentliche Fragestellung der Arbeit war, ob sich das bereits etablierte *in vitro*-Modell zur myokardialen Hypertrophie zur Untersuchung epigenetischer Mechanismen, speziell dem der DNA-Methylierung, eignen würde. In dem durch Hirt et al. (2012) zuvor entwickelten Modell wurden neonatale Rattenherzzellen in einer Fibrinmatrix an flexiblen Silikonhalterungen in dreidimensionaler Gewebekultur kultiviert. Nachdem diese sich zu einem schlagenden, funktionellen Synzytium entwickelt hatten, wurden einzelne EHTs durch Verstärkung der Silikonhalterungen mit Metalldrähten einem erhöhten Widerstand ausgesetzt, wodurch eine akute Nachlasterrhöhung (AN) simuliert wurde. Andere EHTs wurden durch Hinzugabe des α_1 -Rezeptoragonisten Phenylephrin (PE) zum Zellkulturmedium Hypertrophie-induzierend stimuliert. Beide Interventionsgruppen wurden bezüglich verschiedener Parameter mit einer Kontrollgruppe ohne jegliche Intervention verglichen. Während der Zellkultur konnten über regelmäßige videooptische Analysen die Auswirkung der pro-hypertrophen Intervention auf die Kontraktilität der untersuchten EHTs einfach dokumentiert werden. Nach siebentägiger pro-hypertropher Intervention ließ sich für beide Versuchsgruppen eine deutliche Verschlechterung der Kontraktionsparameter Kraft, Kontraktions- und Relaxationszeit (T1, beziehungsweise T2; vgl. Kapitel 3.2.2) verzeichnen. Durch Optimierung der Zellkultur unter serumfreien Bedingungen durch Hinzugabe von Hydrokortison konnte die Anzahl nicht verwendbarer EHTs deutlich reduziert werden und somit die Zahl der EHTs im Versuch erhöht werden. Weiterhin war ein regelhafter Nachweis des pro-hypertrophen Effektes mittels Transkriptionsanalyse auf RNA-Ebene möglich. Die vermehrte Expression der Gene des so genannten fetalen Genprogramms ging zumeist mit einer inversen Korrelation der Methylierungsrate in DNA-Abschnitten in der Nähe des Transkriptionsstarts einher, wie mit dem hier etablierten Pulldown-Assay für die Gene *Nppa*, *Nppb* und *Acta 1* gezeigt werden konnte. Anschließend konnten in einer genomweiten Analyse der Promotormethylierung verschiedene differenziell methylierte Bereiche identifiziert werden.

Ein wichtiger Aspekt der Ergebnisse ist die überraschende zeitliche Dynamik in der Regulation der DNA-Methylierung auch in Kardiomyozyten als differenzierten, nicht teilungsfähigen Zellen. Während die DNA-Methylierung lange Zeit im Allgemeinen als relativ stabiles epigenetisches Merkmal galt, zeigte sich bereits nach siebentägiger mechanischer beziehungsweise chemischer Intervention ein Effekt auf die DNA-Methylierung untersuchter

4 Diskussion

Promotoren. Dies war Grundvoraussetzung für die Untersuchung im nur 7-tägigen *in vitro*-Modell und zeigt, dass auch die Testung von Substanzeffekten (*Drug testing*) auf epigenetische Marker in weiterführenden Versuchen möglich sein dürfte. Diese Ergebnisse zeigten sich konform mit Ergebnissen in Kardiomyozyten durch Gilsbach et al. (2014). Hier konnte gezeigt werden, dass während der Reifung, beziehungsweise Entwicklung von neonatalen über gesunde adulte Kardiomyozyten bis zu pathologisch hypertrophierten Myozyten nach Exposition gegenüber einer akuten Nachlasterhöhung mittels TAC große Genombereiche differenziell methyliert werden. Es muss sich hierbei also auch in differenzierten, im Wesentlichen nicht teilungsfähigen Zellen, um einen durchaus dynamischen Prozess handeln. Weiterhin zeigte sich bei Gilsbach et al. (2014), dass sich das Methylierungsmuster der pathologisch veränderten Kardiomyozyten dem der neonatalen Kardiomyozyten annäherte.

Grundsätzlich eignet sich EHT im 24-Well-Format für Substanztestungen (*Drug screening*), wie in der Arbeit von Hansen et al (2010) beschrieben, da Substanzen unter Ausschluss zahlreicher Variablen bei regelmäßiger Aufzeichnung von Kontraktilitätsparametern am künstlichen Herzgewebe in hoher Stückzahl getestet werden können. Zu Beginn der Arbeit stand die Hypothese, dass EHT auch zur Untersuchung epigenetischer Fragestellungen beitragen könnten. So ist die Untersuchung epigenetischer Regulationsmechanismen in der Herzinsuffizienz am Menschen aufgrund der geringen Verfügbarkeit geeigneten Materials, zum Beispiel von Biopsien gesunder Probanden, deutlich erschwert. Ebenso stellen eine fehlende Standardisierung in der Handhabung von Proben nach Organexplantation sowie eine Polypharmazie durch Herzinsuffizienzmedikation und gegebenenfalls Immunsuppression des Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme mögliche Störfaktoren dar. Insbesondere unter Berücksichtigung der Dynamik, welcher die Mechanismen der DNA-Methylierung unseren Ergebnissen zufolge unterworfen zu sein scheinen, lässt sich mit Hilfe unseres Modells die Anzahl von Variablen und Störfaktoren auf ein Minimum reduzieren und lassen sich unter ständiger Kontrolle funktioneller Parameter Untersuchungen in hoher Stückzahl durchführen.

4.2 Methodische Herausforderungen in der Etablierung des Pulldown-Assays

Zur Quantifizierung methylierter DNA in potentiell differenziell methylierten Promotorregionen wählten wir einen Assay unter Verwendung eines MBD-Proteins und anschließender Quantifizierung mittels RT-qPCR. Im Rahmen der Methodenentwicklung ergaben sich verschiedene technische Schwierigkeiten, welche es zu bewältigen galt. Wie bereits oben erwähnt, stand nur eine geringe Gesamtgewebemenge von ca. 10 mg pro EHT zur Verfügung. Eine möglichst hohe Ausbeute an DNA in hoher Qualität bei gleichzeitiger Extraktion einer ausreichenden Menge von RNA konnte durch die Kombination einer enzymatischen/mechanischen Zellyse in einem speziell für die weiteren Methoden angepassten Lysepuffer mit einer anschließenden Nukleinsäureisolation mittels zweier verschiedener kommerziell erwerblicher Kits (QIAGEN) erreicht werden. Nach Anreicherung der methylierten DNA erfolgte die Amplifikation mittels PCR. Hierbei gestaltete sich die Auswahl spezifischer Primer für die gewünschten Promotorabschnitte der einzelnen Gene mitunter schwierig. Zunächst einmal war es notwendig, wie oben beschrieben, einen Bereich zu identifizieren, welcher eine „CpG-Insel“ - also eine Region mit erhöhter CpG- (Cytosinphosphatidyl-Guanin-) Dichte, in Vertebraten Ziel der DNA-Methylierung - beinhaltet (Ziller et al. 2014). Da es sich bei dem untersuchten Material um genomische DNA und nicht cDNA handelte, also um eine niedrige *Template*-Dichte, und die untersuchten Abschnitte einen hohen Anteil repetitiver Elemente (Haider et al. 2012; siehe auch Kapitel 1.2.1) beinhalteten, kam es wiederholt zur Bildung unspezifischer PCR-Nebenprodukte und Ausbildung von Primer-Dimeren. Dieses Problem ließ sich in den meisten Fällen durch das Design eines individuellen PCR-Programms mittels *Touchdown*-Verfahren beheben (siehe Kapitel 3.3.2). Für einzelne Promotoren, wie beispielweise im Fall von *Serca2a*, war es uns jedoch zunächst nicht möglich, ausreichend spezifische Primer zu entwerfen, weshalb sich hier auch keine Daten zur Einzelpromotormethylierung im Pulldown-Assay erheben ließen.

Die Ergebnisse der RT-qPCR-Reaktionen zur Abschätzung der Promotor-DNA-Methylierung ließen eine regelhafte Tendenz für die Methylierung beziehungsweise Demethylierung einzelner Promotoren erkennen. Bei sehr großer Variabilität und hoher Standardabweichung konnten jedoch wiederholt keine statistisch signifikanten Ergebnisse erreicht werden. Hier können verschiedene unter anderem auch methodische Ursachen zugrunde liegen. So ergab sich durch die geringe Menge eingesetzter DNA eine methodische Ungenauigkeit, da wir entsprechend umfangreiche PCR-Programme mit einer hohen Anzahl von bis zu 40 Replikationszyklen verwendeten. Hierdurch ergab sich trotz größtmöglicher Genauigkeit in

4 Diskussion

der Versuchsdurchführung, welche sich anhand der technischen Replikate (jeweils in Dreifachbestimmung) überprüfen ließ, eine große Streuung innerhalb der Versuchsgruppen.

4.3 Hypertrophe Stimuli führen zu einer differenziellen Methylierung in Kardiomyozyten, welche teilweise mit der Genexpression korreliert.

Nach abgeschlossener Etablierung des oben beschriebenen Pulldown-Assays zur Quantifizierung methylierter DNA erfolgte zunächst exemplarisch die Analyse der Promotorbereiche für einzelne Gene des fetalen Genprogramms mittels RT-qPCR. Wie in Kapitel 3.4 und 3.5 anhand der Transkriptionsanalysen dargestellt, konnte regelhaft eine differenzielle Regulierung der Gene des fetalen Genprogramms beobachtet werden. Die Ergebnisse der Methylierungsanalysen für die einzelnen Promotorbereiche von Nppa, Nppb und Acta 1 waren jedoch statistisch nicht signifikant. Während der Promotorbereich von Nppa und Acta1 in allen Versuchen für die AN- und PE- Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verminderte Pulldown-Rate aufzuweisen schien, ergaben sich für BNP widersprüchliche Ergebnisse. Durch die Analyse der Kontrollgene Oxytocin (Oxt, Positivkontrolle) und *Ubiquitin-conjugating Enzyme E2b* (Ube2b, Negativkontrolle) konnten wir dennoch zeigen, dass der etablierte Pulldown-Assay zur Differenzierung von methylierter und nicht methylierter DNA technisch geeignet ist. Eine Erklärung für diese Ergebnisse wäre, dass entsprechende Promotorbereiche unter Entwicklung einer pathologischen Myokardhypertrophie nicht differenziell methyliert werden. Zumindest für den Promotorbereich von Acta1 ließ sich jedoch in den dargestellten Promotoranalysen mittels RT-qPCR eine geringere Methylierung für die beiden Interventionsgruppen zeigen. Mittels *Whole Genome Methylation*-Array erhobene Daten zeigten Bereiche signifikant verminderter DNA-Methylierung für beide Interventionsgruppen innerhalb des Promotorbereiches von Acta1, sodass die dargestellte Tendenz in Zusammenschau der Versuchsergebnisse doch relevant zu sein scheint. Eine weitere Erklärung für eine fehlende Signifikanz wäre ein methodisch bedingter Verlust an Sensitivität (beispielsweise durch Gesamtgewebeuntersuchung, geringe Menge eingesetzter DNA, hoher Anzahl an Amplifikationszyklen in der PCR, geringe Anzahl Versuchswiederholungen) bei gleichzeitig nur geringen tatsächlichen biologischen Unterschieden.

Die von uns durchgeführten Untersuchungen erfolgten nicht an reinen Kardiomyozyten, sondern am Gesamtgewebe der EHTs. Pro EHT ergab sich eine Gesamtgewebemenge von etwa 10 mg, bei Herstellung der EHTs wurden 500.000 Zellen pro EHT eingesetzt. Zu Versuchsende ist zudem mit einer noch geringeren Zellzahl aufgrund von Zelluntergang während der Kulturdauer zu rechnen. Aufgrund dieser geringen Gewebemenge war es zunächst nicht möglich, eine Zellsortierung für gewebespezifische Untersuchungen vorzuschalten. Neben den eingesetzten Kardiomyozyten finden sich in den EHTs weitere

4 Diskussion

Zellpopulationen wie vorrangig Fibroblasten und Endothelzellen (Pinto et al. 2016). Man könnte also annehmen, dass die Untersuchungsergebnisse durch eine fehlende Isolation der Kardiomyozyten verfälscht seien. Zumindest für die Transkriptionsanalysen, welche ebenfalls nicht zellspezifisch durchgeführt wurden, konnte ein sehr eindeutiger Effekt der akuten Nachlasterrhöhung beziehungsweise der medikamentösen Stimulation auf die Expression der Gene des fetalen Genprogramms gezeigt werden. Da es sich hierbei um zelltypspezifische Veränderungen handelt, entsprechende Gene in Fibroblasten also im Allgemeinen nicht differenziell reguliert werden, ist davon auszugehen, dass die Änderung der Transkription im EHT auch vorwiegend auf Kardiomyozyten zurückzuführen ist. Grzeskowiak et al. (2003) beispielsweise zeigten in Untersuchungen der Genexpression in Myokardbiopsien gesunder Kontrollherzen sowie von Herzen von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, dass der Beitrag der Kardiofibroblasten an den dargestellten Änderungen in der Transkriptionsregulation sehr gering zu sein scheint.

Anders verhält es sich allerdings bei der Untersuchung genomischer DNA. Die Zusammensetzung der untersuchten Zellpopulation im Gesamtgewebe ist hier im Vergleich zur RNA-Analyse von wesentlich größerem Gewicht. Die dynamische Breite der Regulation ist bei nur zwei DNA-Kopien pro Zelle- welche im Extremfall entweder vollständig methyliert oder komplett demethyliert sein können- deutlich geringer, als bei RNA (mit einer Regulationsbreite von einem Vielfachen). Es handelt sich bei der Analyse des Methylierungsstatus einzelner Gene nicht um eine zelltypspezifische Untersuchung und Verdünnungseffekte oder gegenläufige Regulation in verschiedenen Zelltypen stellen hier aus oben genannten Gründen ein verhältnismäßig größeres Problem dar. Käme es also zu wesentlichen Schwankungen in der Zellzusammensetzung unter den Versuchsgruppen könnten diese sich theoretisch in den Versuchsergebnissen widerspiegeln. Gilsbach et al. zeigten im Rahmen genomweiter Untersuchungen zur DNA-Methylierung in verschiedenen Stadien der Entwicklung von der undifferenzierten embryonalen Stammzelle über ausgereifte adulte Kardiomyozyten bis zur Herzinsuffizienz, dass im zeitlichen sowie im Krankheitsverlauf eine Abnahme des Kardiomyozytenanteils im Gesamtgewebe stattfindet (Gilsbach et al. 2014). Diese Feststellung könnte vermuten lassen, dass die von uns gezeigten Veränderungen in EHTs der AN- und PE-Gruppe einem Verlust von Kardiomyozyten im Gesamtgewebe und somit einem erhöhten Fibroblastenanteil geschuldet wären. Letztlich konnte aber gezeigt werden, dass es in unserem Versuchsmodell in den EHTs nach pro-hypertropher Intervention im Vergleich zu den Kontroll-EHTs zwar zu einer Abnahme von Kardiomyozyten (Dystrophin⁺) um circa 20% kommt, jedoch keine Zunahme mesodermaler Zellen (Vimentin⁺) festzustellen ist (Hirt et al. 2015). Eine Zunahme der Fibrose im EHT wäre somit primär durch eine Zunahme der Kollagenproduktion durch die

4 Diskussion

Fibroblasten zu begründen, nicht aber durch eine Proliferation der Fibroblasten (Stenzig et al., 2016). Letztlich ist also durch „Verdünnung“ der DNA-Methylierungsänderungen in den Kardiomyozyten durch die DNA-Methylierung in anderen Zelltypen zumindest mit einer verminderten Sensitivität der Untersuchungsmethode zu rechnen, jedoch kaum mit einem Verlust an Spezifität. Zusätzlich ist davon auszugehen, dass sich die DNA-Methylierung in Zelltypen, in denen keine differentielle Regulation stattfindet, nicht ändert. Eine Zelltyp-spezifische Untersuchung könnte dennoch zur Eindeutigkeit der durchgeführten Versuche beitragen.

Nachdem die Einzelpromotoranalysen Hinweise auf differenziell methylierte Promotoren in EHTs nach akuter Nachlasterhöhung beziehungsweise pharmakologischer Stimulation lieferten, die Einzelpromotoranalyse jedoch oben genannte Einschränkungen mit sich brachte, entschlossen wir uns, die Ergebnisse in einer genomweiten Analyse des Methylierungsstatus der EHTs zu überprüfen. Hierzu wurden, wie oben beschrieben, weitere EHTs nach 14-tägiger Zellkultur einer siebentägigen medikamentösen Stimulation mit Phenylephrin, beziehungsweise akuter Nachlasterhöhung ausgesetzt. Anschließend wurde RNA wie zuvor zur Quantifizierung mittels RT-qPCR isoliert. DNA wurde isoliert, mechanisch fragmentiert und mittels *MethylCap Kit* (Diagenode) angereichert. Die Analyse der angereicherten DNA mittels *Roche NimbleGen Rat DNA Methylation 3x720K CpG Island Plus RefSeq Promoter Array* erfolgte im Leibniz-Institut für Arterioskleroseforschung in Münster. Insgesamt unterstützten die Ergebnisse der *Array*-Analyse die ursprüngliche Hypothese, dass die differentielle Expression einzelner Gene im Rahmen der Entwicklung einer pathologischen kardialen Hypertrophie mit einem charakteristischen Methylierungsmuster einhergeht. Es fanden sich verschiedene differenziell methylierte Regionen, welche zumindest in Teilen mit den Ergebnissen der Einzelpromotoranalysen konform waren. Hierunter hervorzuheben ist die Entdeckung einer großen differenziell methylierten Region innerhalb des *Atp2a2*-Promotorbereiches, sodass anhand unserer Versuchsergebnisse für *Atp2a2* eine negative Korrelation von Methylierungsrate des Promotors und Transkriptionsrate des Gens anzunehmen ist. Die Ergebnisse für *Serca2a* konnten in späteren Versuchen mittels *High resolution melting* durch Stenzig et al. (2016) bestätigt werden. Hierin sahen wir die mittlerweile in zahlreichen Studien belegte Annahme bestätigt, dass eine erhöhte Promotormethylierung überzufällig häufig, jedoch nicht in jedem Fall mit einer verminderten Genexpression einhergeht (Movassagh et al. 2011; Haas et al. 2013; Gilsbach et al. 2014). Ebenso zeigten sich Einzelpromotor- und *Array*-Daten für den *Acta1*-Promotor konform. Zudem zeigte sich auch hier, wie für *Serca2a*, eine inverse Korrelation mit der Genexpression. Für das *Nppa*-Gen zeigten sich jedoch widersprüchliche Ergebnisse in Einzelpromotor- und genomweiter Analyse. Während sich im Pulldown-Assay

4 Diskussion

für beide Interventionsgruppen eine verringerte Methylierungsrate des Nppa-Promotors andeutete, zeigten die *Array*-Daten um den Transkriptionsstartpunkt einen Bereich signifikant vermehrter Methylierung für beide Interventionsgruppen. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür liegt in den oben beschriebenen methodischen Unterschieden. Der Pulldown-Assay bildet die Methylierungsrate eines verhältnismäßig großen PCR-Produktes im zu untersuchenden Bereich ab und wird somit durch die CpG-Insel umgebende DNA-Abschnitte beeinflusst. Dagegen wurden durch den *Array* standardisiert kleine Fragmente (*Probes* von 50 bp Länge) beurteilt, während die Methylierungsrate dazwischenliegender Abschnitte von jeweils 100 Basenpaaren nicht berücksichtigt wurde. Für das Nppb-Gen zeigten sich in den einzelnen Pulldown-Versuchen mit unterschiedlichen MBD-Proteinen jeweils keine statistisch signifikanten und zum Teil auch widersprüchliche Ergebnisse. In der *Array*-Analyse fanden sich zwei differenziell methylierte Bereiche, zum einen für die PE-Gruppe eine vermehrte Methylierung im Promotorbereich sowie für beide Interventionsgruppen eine verminderte Methylierungsrate kurz nach dem Transkriptionsstartpunkt.

Auch wenn eine Veränderung des Methylierungsstatus eines Promotors nicht in jedem Fall mit dem Grad der Genexpression korrelierte, so liefert die Analyse doch zumindest sehr starke Hinweise, dass beide prohypertrophe Interventionen zu gleichförmigen Veränderungen auf epigenetischer Ebene geführt haben. Dies spricht zum einen gegen einen zufälligen Effekt und zum anderen für ein gemeinsames „epigenetisches Hypertrophieprogramm“ unabhängig vom ursprünglichen Stimulus und damit wiederum gegen strikt erkrankungsspezifische Veränderungen (Stenzig et al. 2016). Die DNA-Methylierung spielt also offenbar auch in der Entstehung der kardialen Hypertrophie, beziehungsweise der Herzinsuffizienz eine Rolle, wobei sich letztlich anhand der durchgeführten Untersuchungen eine Kausalität nicht darstellen lässt und somit auch nicht auszuschließen ist, dass es sich bei den dargestellten Unterschieden in der DNA-Methylierung um eine Folge der kardialen Hypertrophie handelt. In der Regulation der Genexpression stellt die DNA-Methylierung neben diversen anderen Elementen wie der Regulation durch Transkriptionsfaktoren, Histonmodifikation, *ATP-Dependent Chromatin Remodelling* und microRNAs nur einen einzelnen von vielen interagierenden Bausteinen (Papait et al. 2013; Nührenberg et al. 2014) dar. Bei der Betrachtung epigenetischer Mechanismen ist insbesondere das Zusammenspiel von DNA-Methylierung mit verschiedenen Histonmodifikationen von Bedeutung, wobei letztere offenbar DNA-Methylierungseffekte auch überlagern kann. Gilsbach et al. stellten beispielsweise fest, dass nicht alle Gene, welche postnatal demethyliert waren, auch exprimiert wurden. Viele dieser im Promotorbereich demethylierten, jedoch nicht exprimierten Gene, wie *Insulin Gene Enhancer Protein* (Isl-1, Islet-1) oder *Paired-like Homeodomain Transcription Factor 2* (Pitx2)

4 Diskussion

zeigten im genomweiten Histon-*Mapping* eine Markierung mit trimethyliertem H3K27me₃. Das Histon H3K27 ist in seinem trimethylierten Status mit einer transkriptionellen Repression assoziiert (Gilsbach et al. 2014). Letztlich wird es in der Zukunft also unbedingt erforderlich sein, das Zusammenspiel der einzelnen epigenetischen Regulationsmechanismen weiter zu beleuchten, um die Rolle der Epigenetik in der Pathogenese der kardialen Hypertrophie, beziehungsweise Herzinsuffizienz wirklich verstehen zu können.

4.4 Erste Versuche zum Einfluss verschiedener (potentieller) DNA-Methyltransferaseinhibitoren auf Kontraktionsverhalten und Gen-Transkription in EHTs

Wie in Kapitel 3.6 beschrieben, ist die Rolle epigenetischer Regulationsmechanismen in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen und folglich auch als möglicher therapeutischer (medikamentöser) Ansatzpunkt in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen gelangt. In den unten vorgestellten *in vivo*- und *in vitro*-Studien konnte für die untersuchten Substanzen ein Effekt auf die DNA-Methylierung verschiedener Gene in Kardiomyozyten gezeigt werden. Wir untersuchten exemplarisch den Einfluss verschiedener Substanzen mit potentiell epigenetischem Wirkmechanismus auf die Kontraktilität und Transkription der Gene des fetalen Genprogramms in EHTs. Wie in Kapitel 3.7 gezeigt, ließ sich nach Exposition der EHTs gegenüber den ausgewählten Substanzen keine Veränderung in der Expression ausgewählter Gene des fetalen Genprogrammes nachweisen. Weiterhin zeigte sich kein Einfluss auf die Kontraktilität in der videooptischen Analyse. Mögliche Erklärungsansätze hierfür sollen im Folgenden erläutert werden.

Trichlorethylen (auch Trichlorethen; TCE) ist ein halogeniertes Hydrokarbon, welches potentiell zu verstärkter DNA-Methylierung führen könnte. Es findet als Lösungsmittel vorwiegend industriellen Nutzen und fand weiterhin bis Mitte des letzten Jahrhunderts Anwendung als Narkotikum, ist jedoch mittlerweile aufgrund einer hohen Toxizität, Kanzerogenität und Teratogenität als solches nicht mehr gebräuchlich. Aufgrund einer in Kanada und den USA weit verbreiteten Grundwasserkontamination mit TCE liegen toxikologische Expositionsstudien vor, von denen einige mögliche Einflüsse auf die Epigenetik beleuchten. In betreffenden Studien wurde vornehmlich der Effekt auf Hepatozyten erforscht, jedoch wurden auch kongenitale kardiale Malformationen beschrieben (WHO Guidelines for drinking-water quality), weshalb sich verschiedene Studien auch mit den Konsequenzen der Exposition von Kardiomyozyten gegenüber TCE beschäftigten. Collier et al. (2003) zeigten in einer Expositionsstudie mit Sprague-Dawley-Ratten einen Einfluss von TCE auf die Expression von verschiedenen Genen, unter anderem *Serca2a*, im Herzgewebe von Rattenembryos bei Exposition während der kardialen Entwicklung. Palbykin et al. (2011) konnten zeigen, dass eine *in vitro*-TCE-Exposition von H9c2-Myoblasten sowie eine intrauterine Exposition von Ratten-Feten zu einer vermehrten Methylierung des *Atp2a2*-Promotors führte, welche mit einer verminderten Genexpression korrelierte. In unserem Modell ließen sich auf transkriptioneller Ebene nach mehrtägiger Exposition der EHTs gegenüber TCE keine Veränderungen im Vergleich zu den Kontroll-EHTs nachweisen. Im Gegensatz zu Palbykin verwendeten wir jedoch keine embryonalen

4 Diskussion

Zellen, sondern neonatale, kaum mehr teilungsfähige Kardiomyozyten (Soonpaa et al. 1996; Soonpaa et al. 2015). Eine akute Toxizität an differenzierten Kardiomyozyten wurde bislang auch noch nicht beschrieben. Weiterhin handelt es sich bei TCE um eine relativ instabile und flüchtige Substanz, so dass möglicherweise keine ausreichende chemische Stabilität im offenen System in der Zellkultur gegeben war.

Eine weitere untersuchte Substanz war Hydralazin. Hierbei handelt es sich, wie zuvor beschrieben, um ein Antihypertensivum, welches über eine Relaxation der glatten Muskulatur, vornehmlich von Arteriolen, zu einer Reduktion des peripheren Widerstandes und somit zu einer Senkung der Nachlast und im Endeffekt des Blutdrucks führt. Letztlich sind die Wirkmechanismen nicht gänzlich geklärt, es scheint jedoch mittlerweile eindeutig, dass Hydralazin auch epigenetische Regulationsmechanismen beeinflusst (Csoka and Szyf 2009). Über Inhibierung einer Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinase) beeinflusst Hydralazin die Menge und Aktivität der Erhaltungs-DNA-Methyltransferase DNMT1 und hat somit bei Zellteilung und Basenreparatur demethylierende Eigenschaften. Kao et al. untersuchten den Effekt von Hydralazin in verschiedenen Konzentrationen auf die Expression sowie die Promotormethylierung von *Serca2a* in atrialen Mauskardiomyozyten-ähnlichen Zellen (HL-1-Zellen), sowie in einem *in vivo*-Modell der medikamentös induzierten kardialen Hypertrophie in Ratten (Kao et al. 2011). Sie konnten in Isoprenalin-induzierter Hypertrophie bei gleichzeitiger Behandlung mit Hydralazin eine signifikant erhöhte Expression von *Serca2a* bei gleichzeitiger Hypomethylierung von CpG-Inseln innerhalb des *Serca2a*-Promotors nachweisen. Dies ging mit modifiziertem Calcium-*Handling* in den untersuchten HL-1-Kardiomyozyten einher und korrelierte mit einer verminderten DNMT1-Proteinkonzentration. In den von uns durchgeführten Expressionsanalysen an EHTs nach Exposition gegenüber Hydralazin zeigten sich im Gegensatz hierzu keine Veränderungen in der Konzentration ausgewählter Transkripte, insbesondere nicht von *Serca2a*. Die untersuchten EHTs waren jedoch keinem pro-hypertrophen Stimulus ausgesetzt, es erfolgte lediglich die Exposition der EHTs gegenüber Hydralazin in der von Kao et al. (2011) verwendeten Konzentration (30 μ M) und der Vergleich mit unbehandelten Kontrollen. Nachdem sich hier kein Einfluss auf die Genexpression darstellen ließ verzichteten wir auf die weitere DNA-Analyse.

Während Kao et al. (2011) anhand ihrer Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen differentieller Promotormethylierung in Kardiomyozyten im Hypertrophiemodell und veränderter Konzentrationen der DNA-Methyltransferase 1 herstellen, wird die Rolle letzterer in der Pathogenese der Herzinsuffizienz durch die Arbeitsgruppe Nührenberg et al. (2015) in Frage gestellt. Diese Autoren gingen davon aus, dass der Erhaltungs-DNA-

4 Diskussion

Methyltransferase 1 aufgrund der fehlenden Teilungsfähigkeit der Kardiomyozyten grundsätzlich keine wesentliche Rolle für beobachtete Veränderungen des Methylierungsstatus in der Herzinsuffizienz zugesprochen werden kann. Sie untersuchten deshalb die Rolle der DNA-Methyltransferase 3a/b in der Funktion des gesunden Herzens, sowie in der Pathogenese der Herzinsuffizienz im *in vivo*-Modell. Hierzu generierten sie einen herzspezifischen *Double Knock Out* (KO) von DNMT3a/b in Mäusen mit einer Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Myosin Leichtkettenpromotors (Myl7; MLCCre). Die molekularbiologischen und funktionellen Konsequenzen des *Knock Outs* wurden in Kontroll-KO-Mäusen, sowie in Mäusen mit zusätzlicher Hypertrophieinduktion mittels TAC verglichen. In der Studie zeigte sich kein Unterschied in kardialer Funktion oder Morphologie im Vergleich zwischen KO- und Kontrollmäusen, weder mit noch ohne Nachlasterhöhung. Es zeigten dennoch einige Gene eine erhöhte Transkriptionsrate, welche mit einer verminderten Methylierungsrate korrelierte. Folglich führt ein KO von DNMT3a/b tatsächlich zu einer gestörten *de novo*-Methylierung, welche jedoch für eine regelhafte kardiale Funktion nicht relevant zu sein schien. In einer früheren Studie der Arbeitsgruppe verwendeten Gilsbach et al. (2014) ebenfalls ein Tiermodell mit einem *Knock Out* von DNMT3a/b mit einer Tamoxifen-induzierten Cre-Rekombinase unter Kontrolle des kardialen Mlc2a-Promoters. Exemplarisch wurde der Einfluss der fehlenden DNMT3-Aktivität auf den postnatalen Isoformenwechsel für das Sarkomerprotein Troponin I (fetales Tnni1, adultes Tnni3) untersucht. Tatsächlich zeigte sich eine fehlende postnatale Methylierung von Tnni1, wodurch eine postnatale Repression des Gens partiell aufgehoben werden konnte. Funktionelle Konsequenzen wurden nicht festgestellt, der perinatale Isoformenwechsel von Sarkomerproteinen stellt jedoch einen wichtigen Aspekt in der Entwicklung der Myozyten dar und hat Einfluss auf deren Kontraktilität (Siedner et al. 2003). Während Nührenberg et al. die *de novo*-Methylierung durch die DNMT3 für eine intakte Herzfunktion als verzichtbar ansehen, zeigten Vujic et al. (2015) ebenfalls in einem Kardiomyozyten-spezifischen *Knock Out* der DNMT3b die spontane Entwicklung einer Kardiomyopathie postnatal. Für diese kontroversen Ergebnisse sind unter Umständen auch methodische Unterschiede in den verschiedenen Arbeiten von Relevanz. Diese liegen unter anderem in der Durchführung des *Knock Outs*. Während Nührenberg et al lediglich eine katalytische Domäne beider DNMT3s unterdrückten, erfolgte durch Vujic et al ein kompletter *Knock Out* von DNMT3b. Unklar bleibt auch, inwiefern beispielsweise der Zeitpunkt des *Knock Outs* eine Rolle für die kontroversen Ergebnisse spielt und ob- insbesondere bei sehr frühem Verlust der DNMT3-Aktivität (wie bei Nührenberg et al.)- diese über andere Isoformen kompensiert werden kann. Einen weiteren Faktor könnten die unterschiedlichen Promotoren darstellen, welche für den *Knock Out* verwendet wurden (Mlc2a vs. Myl7 vs. α -MHC). In der Summe legen diese Ergebnisse nahe, dass auch im Hinblick auf die Verwendung der DNMT-Inhibitoren als Arzneistoffe in der

4 Diskussion

Herzinsuffizienztherapie die Rolle der DNA-Methyltransferasen, beziehungsweise der Effekt ihrer Abwesenheit auf die Funktion der Kardiomyozyten weiter zu beleuchten ist.

Beispiele für bereits als Medikament zugelassene demethylierende Substanzen sind die nicht Isoform-spezifischen nukleosidischen DNMT-Inhibitoren 5-Azacytidin (5-Aza, Vidaza) und 5-Aza-2'-deoxycytidin (5-Aza-dC, Decitabin, Dagocon). Hierbei handelt es sich um synthetische Nukleoside mit hoher Strukturähnlichkeit zum Cytidin. Werden sie an dessen Stelle in die DNA beziehungsweise RNA integriert, werden hier DNA-Methyltransferasen immobilisiert und gehemmt, was eine Hypomethylierung zur Folge hat. Anwendung finden die Substanzen in der Therapie myelodysplastischer Syndrome, der chronischen myelomonozytären Leukämie sowie der akuten myeloischen Leukämie. Watson et al. (2015) konnten in aktivierten humanen Fibroblasten sowie in einem *in vivo*-Modell mit hypertensiven Ratten durch Zugabe von 5-Aza die durch TGF- β bzw. durch die Hypertension induzierte Fibrose hemmen. Die Expression typischer Markergene wie Kollagen 1 und 3 sowie α -Smooth Muscle Actin (α SMA) war vermindert, zudem zeigte sich eine geringer ausgeprägte Fibrose auch in funktionellen und histologischen Untersuchungen. Ein Effekt der Behandlung mit 5-Aza auf die Kardiomyozyten selbst konnte durch eine verminderte Zunahme der Fläche der Kardiomyozyten in planimetrischen Messungen im Gewebe des linken Ventrikels, sowie eine geringere Zunahme des Wanddiameter des linken Ventrikels und des intraventrikulären Septums in der Echokardiographie als Ausdruck einer verminderten kardialen Hypertrophie dargestellt werden. Kou et al. (2010) beschrieben eine Zunahme des absoluten DNA-Gehaltes sowie eine Reaktivierung des fetalen Genprogramms und vermehrte Histonacetylierung in Kardiomyozyten nach Behandlung neonataler Ratten mit 5-Azacytidin und sahen hierin sogar einen möglichen therapeutischen Ansatz. 5-Azacytidin bzw. 5-Aza-2'-deoxycytidin sind nukleosidische DNMT-Inhibitoren und hemmen die DNA-Methylierung nach ihrer Integration in die DNA. Wie ein schneller Effekt auf postmitotische Zellen zu Stande kommen könnte, ist daher aktuell noch umstritten. Es wird diskutiert ob 5-Azacytidin möglicherweise im Zuge von DNA-Reparaturvorgängen in die DNA integriert werden kann, beziehungsweise zusätzlich zur passiven Demethylierung auch eine aktive Demethylierung der DNA bewirken kann (Szyf 2010). Auch wenn eine Wirkung in nicht proliferierenden Zellen durch aktive Demethylierung denkbar ist, so ist die Wirkung weder zelltyp- noch genspezifisch. Es bleibt somit fraglich, ob die Toxizität in rasch proliferierenden Zellen gegenüber einem möglichen positiven Effekt an Kardiomyozyten bei ausreichender Dosierung nicht überwiegen würde.

4.5 Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit ist es uns gelungen, eine Methode zur Analyse des DNA-Methylierungsstatus von Promotorbereichen zu etablieren und anhand des bereits zuvor etablierten *in vitro*-Modells der kardialen Hypertrophie im EHT den dynamischen Prozess der differentiellen DNA-Methylierung analog zu charakteristischen Transkriptionsveränderungen in der pathologischen kardialen Hypertrophie darzustellen. Zu Beginn unserer Forschungsarbeit lagen insgesamt nur sehr wenige wissenschaftliche Arbeiten zur Rolle epigenetischer Regulationsmechanismen in der Pathogenese der Herzinsuffizienz vor. Mittlerweile existieren verschiedene Studien, welche trotz methodischer Unterschiede keinen Zweifel an der Relevanz der Epigenetik in der Differenzierung von Kardiomyozyten sowie in der Pathogenese der Herzinsuffizienz lassen. Obwohl sich hier in der Zwischenzeit ein rasch wachsendes Forschungsfeld entwickelt hat und insbesondere die Interaktion von DNA-Methylierung und Histonmodifikationen sowie ihr Einfluss auf die Transkriptionsregulation zunehmend entziffert werden können, bleibt es dennoch eine wesentliche Aufgabe für die nächsten Jahre, die Vernetzung der einzelnen verschiedenen Mechanismen weiter zu beleuchten und zu einem großen Ganzen zusammenzufügen. Letztlich bleibt auch noch offen, inwiefern diese Erkenntnisse in Zukunft Ansatzpunkt für neue medikamentöse Therapien sein können. Eine besondere Herausforderung bleibt hierbei eine zelltypspezifische Einflussnahme auf die DNA-Methylierung.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Herzinsuffizienz stellt eine der häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrienationen dar. Mit derzeitig verfügbaren Therapieoptionen kann eine Verbesserung des funktionellen Status des Herzens sowie eine Verminderung der Symptomenlast erzielt werden und die Mortalität gesenkt werden. Die Herzinsuffizienz mit hochgradig reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion geht jedoch weiterhin mit einer sehr schlechten Prognose einher. Das heterogene Feld der Epigenetik ist in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus wissenschaftlicher Aufmerksamkeit gelangt, und in verschiedenen medizinischen Bereichen konnten der Einfluss epigenetischer Regulationsmechanismen in Zelldifferenzierung, -homöostase sowie Pathogenese entschlüsselt und therapeutischen Optionen zugänglich gemacht werden. Währenddessen mangelte es lange an Forschungsarbeit zur Rolle der Epigenetik in der Pathogenese kardiovaskulären Erkrankungen.

Unsere Bestrebung war es somit, den Einfluss epigenetischer Regulationsmechanismen, speziell den der DNA-Promotormethylierung, in der Pathogenese der kardialen Hypertrophie, welche einen wesentlichen Risikofaktor für die Entstehung der Herzinsuffizienz darstellt, zu beleuchten. Hierzu wurden künstliche Herzgewebe (EHTs) im *24-Well*-Format nach bereits etabliertem Protokoll nach 14-tägiger Zellkultur und unter Tierserum-freien Bedingungen entweder einer akuten Nachlasterhöhung oder der Stimulation mit dem $\alpha 1$ -Rezeptoragonisten Phenylephrin ausgesetzt und anschließend Effekte auf transkriptioneller Ebene sowie auf die DNA-Methylierung in Promotorbereichen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen untersucht. Hierzu verwendeten wir zunächst eine durch uns etablierte Methodik zur Quantifizierung methylierter DNA mittels quantitativer PCR sowie einen genomweiten Methylierungs-Array. Wesentliche Ergebnisse der Arbeit sind im Folgenden kurz dargestellt:

- Die von uns etablierte Methode zur Quantifizierung der DNA-Methylierung mittels quantitativer PCR kann ausreichend zwischen methylierter und nicht methylierter DNA unterscheiden.
- Bei der DNA-Methylierung handelt es sich auch in differenzierten Kardiomyozyten um einen dynamischen Prozess.
- Das verwendete in vitro-Modell der kardialen Hypertrophie ist zur Untersuchung epigenetischer Merkmale in Kardiomyozyten und im Folgenden auch zur Testung von Substanzen mit epigenetischem Wirkpotential geeignet.
- Charakteristische Veränderungen in der Transkriptionsregulation von Kardiomyozyten nach Hypertrophie-Induktion gehen mit einer differenziellen

Methylierung einzelner Promotorbereiche einher, welche teilweise eine inverse Korrelation mit der Expression des jeweiligen Gens aufweisen. Diese Veränderungen sind größtenteils unabhängig vom jeweiligen Stimulus und offenbar vielmehr ein gemeinsames Charakteristikum der pathologischen kardialen Hypertrophie.

Anhand dieser Erkenntnisse ist es nun möglich, mit Hilfe eines relativ einfachen Modells der kardialen Hypertrophie unter Monitoring des Kontraktilitätsverhaltens der Kardiomyozyten und unter weitest gehendem Ausschluss unkontrollierbarer Störfaktoren epigenetische Mechanismen und Substanzeffekte zu testen.

6 SUMMARY

Congestive heart failure still represents one of the main causes of death in Germany. Therapeutic options may improve the functional status of the heart and decrease mortality and impairment by symptoms such as dyspnea, but still there are no causal therapeutic options available and progressive heart failure remains associated with a very poor prognosis. The emerging field of epigenetics shed light on the influences of mechanisms such as DNA methylation and histone modification in cell differentiation, homeostasis and pathogenesis and made them accessible as a target for novel therapeutic strategies. Whilst first epigenetic drugs are approved for human use in the field of oncology, the role of DNA methylation in heart failure remained unclear.

Our aim was to investigate the influence of epigenetic mechanisms, DNA methylation in particular, in the pathogenesis of cardiac hypertrophy, which is a main risk factor for the development of congestive heart failure. Therefore we used engineered heart tissue (EHT) in a 24-well-format in conjunction with a well-established protocol of hypertrophy-induction. After 14 days of cell culture EHTs were either exposed to an acute increase in afterload or to pharmacological stimulation by the α 1-receptor agonist phenylephrine. We then analysed changes in gene expression as well as effects on promoter methylation in quantitative real time PCR and with a genome wide promoter methylation array. To this end we needed to establish a method for enrichment of methylated DNA-fragments.

Main results of this work were the following:

- The newly established method for quantification of methylated DNA in real time PCR does sufficiently differentiate between methylated and non-methylated DNA-fragments.
- DNA-methylation appears to be a dynamic process even in terminally differentiated cardiac myocytes.
- Accordingly, the in vitro model of cardiac hypertrophy is well suited for the investigation of epigenetic features associated with pathological hypertrophy and may as well be utilized for testing of potential epigenetic drugs.
- Characteristic changes in gene transcription in hypertrophic cardiac myocytes are accompanied by differential methylation of the promoter region of the corresponding gene, and partly show an inverse correlation with the latter.
- The observed changes in the methylation patterns appeared mainly independent of the underlying hypertrophic stimulus and rather seem to be a common feature of cardiac hypertrophy.

We are thus able to investigate epigenetic mechanisms of DNA regulation and potential epigenetic drugs in cardiac tissue in a simple model of cardiac hypertrophy largely avoiding inadvertent influencing factors.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin- <i>Converting</i> -Enzym
ACTA1	α -skelettales Aktin
ADH	Antidiuretischen Hormon
α -MHC	α - <i>Myosin heavy chain</i> , α -Isoform der schweren Myosinkette
AN	Akute Nachlasterhöhung
ANP	Atriales natriuretisches Peptid

B

BDM	2,3-Butanedionmonoxim
BER	<i>Base excision repair</i>
BGA	Blutgasanalyse
β -MHC	β - <i>myosin heavy chain</i> , β -Isoform der schweren Myosinkette
BNP	<i>Brain natriuretic</i> Peptid, natriuretische Peptid Typ B
bpm	<i>Beats per minute</i> , Schläge pro Minute

C

Ca ²⁺	Calcium
CBFHH	<i>Calcium and bicarbonate free Hanks with HEPES</i>
CEE	<i>Chick embryo extract</i> , Hühnerembryonenextrakt
cDNA	Komplementäre DNA
CK	Kreatinkinase
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
ct	<i>Cycle threshold</i>
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>

D

d	<i>Day</i> , Tag
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase

E

EHT	<i>Engineered heart tissue</i> , künstliches Herzgewebe
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESC	<i>European Society of Cardiology</i>

F

F	<i>Force</i> , Kraft
For	<i>Forward</i> , 5'-3' Primer
FKS	Fötale Kälberserum

G

Gadd45a	<i>Growth arrest and DNA damage inducible protein 45 a</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guaninnukleotiddiphosphat
GTP	Guaninnukleotidtriphosphat

7 Abkürzungsverzeichnis

H

h	<i>Hour</i> , Stunde
HAT	Histon-Acetyltransferase
HBSS	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>
HDAC	Histondeacetylasen
HDMT	Histon-Demethylase
HL	Hydralazin
HK	Hydrokortison
HMT	Histon-Methyltransferase
HS	<i>Horse serum</i> , Pferdeserum
Hz	Hertz

I

IGF2	<i>Insulin-like growth factor II</i>
IgG	Immunglobulin G
Ing1	<i>Inhibitor of growth 1 (Ing1)</i>

K

Ktr.	Kontrolle
------	-----------

M

M	Mol/l
MBD	<i>Methyl-CpG-binding domain</i> , Methyl-CpG bindende Domäne
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MeCP	<i>Methyl-CpG binding protein</i>
MeDIP	<i>Methylated DNA immunoprecipitation</i>
min.	Minute
MIRA	<i>Methylated Island Recovery Assay</i>
mN	Millinewton
MRA	Mineralokortikoidrezeptorantagonisten
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure

N

n	Anzahl der untersuchten Proben, biologische Replikate
NaOH	Natronlauge
NKM	Nichtkardiomyozytenmedium
NuRD	<i>Nucleosome remodelling and histone deacetylation</i>
NYHA	<i>New York Heart Association</i>

O

OD	Optische Dichte
----	-----------------

P

p	p-Wert, Signifikanzniveau
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phenylephrin
PPG	PCR-Produkt-Größe
PS	Pferdeserum

Q

qPCR	<i>Quantitative real time polymerase chain reaction</i> , quantitative Echtzeit-PCR
------	---

7 Abkürzungsverzeichnis

R

RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RefSeq	<i>NCBI Reference Sequence</i>
rev	<i>Reverse, 3'–5' Primer</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
RT-qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR mit reverser Transkription

S

s	Sekunde
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SD	<i>Standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard error of the mean</i> , Standardfehler
Serca2a	Sarco/endoplasmatische Ca ²⁺ -ATPase 2, Typ P-ATPase
SHR	<i>Spontaneously hypertensive rat</i> , spontan hypertensive Ratte

T

T	<i>time</i> , Zeit
T1	Kontraktionszeit
T2	Relaxationszeit
T ₃	Trijodthyronin
TAC	<i>Transversal aortic constriction</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TCE	Trichlorethylen
TDG	<i>Thymine dependent glycosylase</i>
<i>Tet</i>	<i>Ten-eleven translocation-Oxygenasen</i>
TGFβ	<i>Transforming growth factor β</i>
TRIS	Trisaminomethan

U

U	<i>Units</i> , Enzymeinheit
---	-----------------------------

V

V	Volt
---	------

W

W	Watt
---	------

8 LITERATURVERZEICHNIS

Arany ZP (2008) High-throughput quantitative real-time PCR. *Curr Protoc Hum Genet* Chapter 11:Unit 11.10.

Bird A (2007) Perceptions of epigenetics. *Nature* 447:396–8.

Borgel J, Guibert S, Li Y, Chiba H, Schübeler D, Sasaki H, Forné T, Weber M (2010) Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development. *Nat Genet* 42:1093–100.

Collier JM, Selmin O, Johnson PD, Runyan RB (2003) Trichloroethylene effects on gene expression during cardiac development. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 67:488–95.

Csoka AB, Szyf M (2009) Epigenetic side-effects of common pharmaceuticals: a potential new field in medicine and pharmacology. *Med Hypotheses* 73:770–80.

Dawson MA, Kouzarides T (2012) Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* 150:12–27.

Dorn GW, Robbins J, Sugden PH (2003) Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res* 92:1171–5.

Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, Scholz H, Wattachow J, Weil J, Zimmermann W, Dohmen HH, Schäfer H, Bishopric N, Wakatsuki T, (1997) Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *FASEB J* 11(8):683-94.

Fatima N, Schooley JF, Claycomb WC, Flagg TP (2012) Promoter DNA methylation regulates murine SUR1 (Abcc8) and SUR2 (Abcc9) expression in HL-1 cardiomyocytes. *PLoS One* 7:e41533.

Fraga MF (2003) The affinity of different MBD proteins for a specific methylated locus depends on their intrinsic binding properties. *Nucleic Acids Res* 31:1765–1774.

Franchini D-M, Schmitz K-M, Petersen-Mahrt SK (2012) 5-Methylcytosine DNA demethylation: more than losing a methyl group. *Annu Rev Genet* 46:419–41.

Gilsbach R, Preissl S, Gruning BA, Schnick T, Burger L, Benes V, Wurch A, Bonisch U, Gunther S, Backofen R, Fleischmann BK, Schubeler D, Hein L (2014) Dynamic DNA methylation orchestrates cardiomyocyte development, maturation and disease. *Nat Commun* 5:5288.

Haas J, Frese KS, Park YJ, Keller A, Vogel B, Lindroth AM, Weichenhan D, Franke J, Fischer S, Bauer A, Marquart S, Sedaghat-Hamedani F, Kayvanpour E, Kohler D, Wolf NM, Hassel S, Nietsch R, Wieland T, Ehlermann P, Schultz JH, Dosch A, Mereles D, Hardt S, Bacs J, Hoheisel JD, Plass C, Katus HA, Meder B (2013) Alterations in cardiac DNA methylation in human dilated cardiomyopathy. *EMBO Mol Med*. 1–17.

Haider S, Cordeddu L, Robinson E, Movassagh M, Siggins L, Vujic A, Choy M-K, Goddard M, Lio P, Foo R (2012) The landscape of DNA repeat elements in human heart failure. *Genome Biol* 13:R90.

8 Literaturverzeichnis

Hansen A, Eder A, Bonstrup M, Flato M, Mewe M, Schaaf S, Aksehirlioglu B, Schwoerer AP, Uebeler J, Eschenhagen T (2010) Development of a drug screening platform based on engineered heart tissue. *Circ Res* 107:35–44.

Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, Slagboom PE, Lumey LH (2008) Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:17046–9.

Hendrich B, Tweedie S (2003) The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals. *Trends Genet* 19:269–77.

Hill JA, Olson EN (2008) Cardiac plasticity. *N Engl J Med* 358:1370–80.

Hirt MN, Sorensen NA, Bartholdt LM, Boeddinghaus J, Schaaf S, Eder A, Vollert I, Stohr A, Schulze T, Witten A, Stoll M, Hansen A, Eschenhagen T (2012) Increased afterload induces pathological cardiac hypertrophy: a new in vitro model. *Basic Res Cardiol* 107:307.

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

Hohl M, Wagner M, Reil J (2013) HDAC4 controls histone methylation in response to elevated cardiac load. *J Clin Invest* 123(3):1359–1370.

Illingworth RS, Gruenewald-Schneider U, Webb S, Kerr ARW, James KD, Turner DJ, Smith C, Harrison DJ, Andrews R, Bird AP (2010) Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet* 6(9): e1001134.

Kao Y-H, Cheng C-C, Chen Y-C, Chung C-C, Lee T-I, Chen S-A, Chen Y-J (2011) Hydralazine-induced promoter demethylation enhances sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ -ATPase and calcium homeostasis in cardiac myocytes. *Lab Invest* 91:1291–7.

Klose RJ, Bird AP (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 31:89–97.

Korbie DJ, Mattick JS (2008) Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc* 3:1452–6.

Kou CY-C, Lau SL-Y, Au K-W, Leung P-Y, Chimb SS-C, Funga K-P, Wayea MM-Y, Tsui SK-W (2010) Epigenetic regulation of neonatal cardiomyocytes differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 400:278–83.

Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, Ho KKL (1996) The Progression From Hypertension to Congestive Heart Failure. *JAMA* 275(20):1557–1562.

Métivier R, Gallais R, Tiffoche C, Le Péron C, Jurkowska RZ, Carmouche RP, Ibberson D, Barath P, Demay F, Reid G, Benes V, Jeltsch A, Gannon F, Salbert G (2008) Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 452:45–50.

Movassagh M, Choy M-K, Goddard M, Bennett MR, Down TA, Foo RS-Y (2010) Differential DNA methylation correlates with differential expression of angiogenic factors in human heart failure. *PLoS One* 5:e8564.

Movassagh M, Choy MK, Knowles DA, Cordeddu L, Haider S, Down T, Siggins L, Vujic A,

8 Literaturverzeichnis

- Simeoni I, Penkett C, Goddard M, Lio P, Bennett MR, Foo RS (2011) Distinct epigenomic features in end-stage failing human hearts. *Circulation* 124:2411–22.
- Mudd JO, Kass DA (2008) Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* 451:919–28.
- Nan X, Meehan RR, Bird A (1993) Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res* 21:4886–92.
- Neumann T, Biermann J, Neumann A, Wasem J, Ertl G, Dietz R, Erbel R (2009) Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives. *Dtsch Arztebl Int* 106:269–75.
- Nührenberg T, Gilsbach R, Preissl S, Schnick T, Hein L (2014) Epigenetics in cardiac development, function, and disease. *Cell Tissue Res* 356:585–600.
- Ordovás JM, Smith CE (2010) Epigenetics and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* 7:510–9.
- Papait R, Condorelli G (2010) Epigenetics in heart failure. *Ann N Y Acad Sci* 1188:159–64.
- Papait R, Greco C, Kunderfranco P, Latronico MVG, Condorelli G (2013) Epigenetics: a new mechanism of regulation of heart failure? *Basic Res Cardiol* 108:361.
- Pinto AR, Ilinykh A, Ivey MJ, Kuwabara JT, D'Antoni ML, Debuque R, Chandran A, Wang L, Arora K, Rosenthal N, Tallquist MD (2017) Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res* 118:400–409.
- Rauch T a, Pfeifer GP (2010) DNA methylation profiling using the methylated-CpG island recovery assay (MIRA). *Methods* 52:213–7.
- Schmitz K-M, Schmitt N, Hoffmann-Rohrer U, Schäfer A, Grummt I, Mayer C. (2009) TAF12 recruits Gadd45a and the nucleotide excision repair complex to the promoter of rRNA genes leading to active DNA demethylation. *Mol Cell* 33:344–53.
- Schomacher L (2013) Mammalian DNA demethylation: multiple faces and upstream regulation. *Epigenetics* 8:679–84.
- Siedner S, Krüger M, Schroeter M, Metzler D, Roell W, Fleischmann BK, Hescheler J, Pfitzer G, Stehle R (2003) Developmental changes in contractility and sarcomeric proteins from the early embryonic to the adult stage in the mouse heart. *J Physiol* 548:493–505.
- Simpson P, McGrath a., Savion S (1982) Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. *Circ Res* 51:787–801.
- Soonpaa MH, Kim KK, Pajak L, Franklin M, Field LJ (1996) Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *Am J Physiol* 271:H2183–H2189.
- Soonpaa MH, Zebrowski DC, Platt C, Rosenzweig A, Engel FB, Field LJ (2015) Cardiomyocyte Cell-Cycle Activity during Preadolescence. *Cell* 163:781–782.
- Stenzig, Justus; Foo RS-Y (2001) DNA Methylation in Heart Failure. *Epigenetics Card Dis* 17:17–18.

8 Literaturverzeichnis

Stenzig J, Hirt MN, Löser A, Bartholdt LM, Hensel J-T, Werner TR, Riemenschneider M, Indenbirken D, Guenther T, Müller C, Hübner N, Stoll M, Eschenhagen T (2016) DNA methylation in an engineered heart tissue model of cardiac hypertrophy: common signatures and effects of DNA methylation inhibitors. *Basic Res Cardiol.* (2016) 111:9

Szyf M (2010) DNA methylation and demethylation probed by small molecules. *Biochim Biophys Acta* 1799:750–9.

Vujic A, Robinson EL, Ito M, Haider S, Ackers-Johnson M, See K, Methner C, Figg N, Brien P, Roderick HL, Skepper J, Ferguson-Smith A, Foo RS (2015) Experimental heart failure modelled by the cardiomyocyte-specific loss of an epigenome modifier, DNMT3B. *J Mol Cell Cardiol* 82:174–183.

Watson CJ, Horgan S, Neary R, Glezeva N, Tea I, Corrigan N, McDonald K, Ledwidge M, Baugh J (2015) Epigenetic Therapy for the Treatment of Hypertension-Induced Cardiac Hypertrophy and Fibrosis. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 21(1):127-37.

Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL, Schübeler D (2005) Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet* 37:853–62.

Zeisberg EM, Kalluri R (2010) Origins of cardiac fibroblasts. *Circ Res* 107:1304–1312.

Ziller MJ, Gu H, Müller F, Donaghey J, Tsai LT-Y, Kohlbacher O, De Jager PL, Rosen ED, Bennett DA, Bernstein BE, Gnirke A, Meissner A (2014) Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature.* 500:477–481.

9 VERÖFFENTLICHUNGEN

Originalarbeiten

Stenzig J, Hirt MN, Löser A, **Bartholdt LM**, Hensel JT, Werner TR, Riemenschneider M, Indenbirken D, Guenther T, Müller C, Hübner N, Stoll M, Eschenhagen T (2016) DNA methylation in an engineered heart tissue model of cardiac hypertrophy: common signatures and effects of DNA methylation inhibitors. *Basic Res Cardiol*.

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

Abstracts/Kongressbeiträge

Bartholdt LM, Stenzig J, Hirt MN, Eder A, Hansen A, Eschenhagen T. Engineered Heart Tissue – A Useful Tool to Investigate Fast Epigenetic Dynamics in Cardiomyocytes. *Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung, Herbsttagung und Jahrestagung der Arbeitsgruppe Rhythmologie*, Hamburg, Deutschland, 11.-13. Oktober 2012.

10 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Thomas Eschenhagen, für die vertrauensvolle Vergabe des spannenden Dissertationsthemas, sowie die Ermöglichung der praktischen Durchführung der Versuche im Institut für experimentelle Pharmakologie.

Dr. Justus Stenzig und Dr. Marc Hirt möchte ich zunächst für die *exzellente* wissenschaftliche Betreuung der Arbeit danken. Weit über das Maß des Selbstverständlichen hinaus reichte jedoch die freundschaftliche Unterstützung und stete Motivation, wenn es mal nicht nach Plan lief. Ich danke beiden für konstruktive und unterhaltsame Diskussionen an der Kaffeemaschine, den einen oder anderen Kalauer im richtigen Moment, für das geduldige Korrektur-lesen, für das ausdauernde Nachhaken bis zur Fertigstellung der Arbeit. Mit Euch stellte diese Arbeit nicht nur eine besondere Herausforderung in meinem beruflichen Werdegang dar, sondern auch einfach eine sehr schöne Zeit.

Ich danke Thomas Schulze, June Uebeler und ganz besonders herzlich Grit Höppner für die technische Unterstützung im Labor. Dr. Alexandra Eder danke ich einerseits für die fachliche Unterstützung im Labor, bei der Zellkultur und an der „White box“, viel mehr aber noch für die freundschaftliche und sportliche Verbindung die darüber hinaus entstanden ist.

Meinen Eltern, Catrin und Jörg Bartholdt, danke ich für ihre bedingungslose Liebe und Unterstützung in jeder Lebenslage. Ihr habt mir das Studium ermöglicht, mir zu jeder Zeit den Rücken freigehalten und mich motiviert. Um die Dankbarkeit für Eure Geduld, Verständnis, Fürsorge und Vertrauen auf Papier zu bringen fehlen mir die Worte.

11 LEBENSLAUF

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

12 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Datum:

Unterschrift: