

Aus dem Bereich Innere Medizin III
Klinische und Experimentelle Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Prof. Dr. med. M. Böhm)

Epigenetische Regulationsmechanismen in der Herzinsuffizienz

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2014

vorgelegt von Angela Mayumi Zimmer
geb. am 16.05.1984 in Frankfurt a.M.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	4
1. Zusammenfassung.....	9
Abstract.....	10
2. Einleitung	
2.1 <i>Definition der Herzinsuffizienz</i>	11
2.2 <i>Genetische Veränderungen in herzinsuffizienten Zellen</i>	14
2.3 <i>Epigenetik und Herzinsuffizienz</i>	15
2.4 <i>Die Bedeutung des RE1 Silencing Transkription Faktor (REST) im Rahmen der Herzinsuffizienz</i>	18
2.5 <i>Die Bedeutung von HDAC4 im Rahmen der Herzinsuffizienz</i>	19
2.6 <i>Die Entstehung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)</i>	21
2.7 <i>Die Rolle von ROS im Rahmen der Herzinsuffizienz</i>	23
2.8 <i>Fragestellung dieser Arbeit</i>	25
3. Material und Methoden	
3.1 <i>Materialien</i>	26
3.2 <i>Chromatin Immunopräzipitation (ChIP Assay)</i>	27
3.3 <i>PCR - Polymerase Chain Reaktion</i>	31
3.4 <i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	32
3.5 <i>RNA Isolation und RNA-Messung</i>	33
3.6 <i>RT-PCR – Reverse Transkription</i>	35
3.7 <i>Real-Time PCR</i>	36
3.8 <i>Western Blot</i>	39
3.9 <i>Pulldown Assay</i>	43
3.10 <i>SDS-PAGE</i>	44
3.11 <i>Western Transferblot</i>	46
3.12 <i>Langendorff-Anlage</i>	48
3.13 <i>Working Heart</i>	50

3.14 Geräte.....	51
4. Ergebnisse	
4.1 Genexpressionsprofil bei terminaler Herzinsuffizienz.....	52
4.2 Die Rolle des RE1 Silencing Transkription Faktor (REST) bei der Reaktivierung der fetalen Gene ANP und BNP.....	54
4.3 HDAC4 als signal-responsiver Repressor fetaler Gene.....	57
4.4 Oxidiertes HDAC4 in Stress-induzierten Mäuseherzen.....	60
4.5 Einfluss oxidativen Stresses auf den nukleären Export von HDAC4.....	61
4.6 Einfluss akuter Nachlasterrhöhung im Working Heart-Modell auf den nukleären Export von HDAC4.....	63
4.7 Einfluss von akuter TAC auf den HDAC4 –Export.....	65
5. Diskussion	
5.1 Die Rolle von REST in humanem Myokardgewebe.....	67
5.2 Der Export von HDAC4 korreliert mit Reaktivierung von ANP und BNP infolge chronischer Nachlasterrhöhung.....	69
5.3 Akute Erhöhung von oxidativem Stress erhöht nicht den Export von HDAC4.....	71
5.4 Klinische Bedeutung und Ausblick.....	74
6. Literaturverzeichnis.....	79
7. Publikation, Abstracts und Danksagung.....	88
8. Lebenslauf.....	90

Abkürzungen

α MHC	alpha Myosin Heavy Chain
α Ska	alpha Skeletal Muscle Aktin
Abb.	Abbildung
ACEI	ACE-Inhibitor
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ARB	Angiotensinrezeptor-Blocker
AT ₁	Angiotensinrezeptor-Blocker
β -MHC	beta Myosin Heavy Chain
BB	Beta-Blocker
BNP	Brain natriuretic peptide
bp	Basenpaare
C57/BL6	Mäusestamm von Charles River
CACNA1H	Calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1H
cAMP	cyclisches Adenosin-5`-Phosphat
CaMK	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CRT	kardiale Resynchronisationstherapie
C-Terminus	Carboxyl-Terminus einer Desoxyribonukleinsäure
Ct-Wert	Cycle Threshold
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EF	Ejektionsfraktion
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
F	failing (=kranke) Herzen
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
°C	Grad Celsius
g	Gramm
x g	x Erdbeschleunigung
G9a	= EHMT2 (euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2)
GSH	Gluthathion
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HAT	Histon Acetyltransferase
HCN2	Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 2
HCN4	Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4
HDAC	Histondeacetylase
HDAC4	Hiistondeacetylase 4
HDACi	Histondeacetylase-Inhibitor
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinmethan]-sulfonsäure
HI	Herzinsuffizienz
HMT	Histon Methyltransferase
HP1	Heterochromatinprotein 1
H1	Histon 1
H2A	Histon 2A
H2B	Histon 2B
H3	Histon 3
H4	Histon 4
ICD	implantierbarer Kardioverter-Defibrillator
ICM	ischämische Kardiomyopathie

IE	international unit
IgG	Immunglobulin G
IOD	Intensity of optical density
i.v.	intravenös
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KHK	koronare Herzkrankheit
LiCl	Lithiumchlorid
LV	linksventrikulär
LVH	linksventrikuläre Hypertrophie
M	Mol, molar
mA	milliampere
MEF2	myocyte enhancer factor-2
MHC-Beta	myosin heavy chain- Beta
mg	10 ⁻³ Gramm
ml	10 ⁻³ Liter
mM	10 ⁻³ Mol
mm	10 ⁻³ Meter
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
NF	non failing (=gesunde) Herzen
ng	10 ⁻⁶ g
NLS	„nuclear localisation sequence“ (Kernlokalisierungssignal)
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NOX	NAD(P)H Oxidase
NOX4	NAD(P)H Oxidase 4
NP-40	= Igepal, ein Detergenz

NRSE	negative regulatory silencer element
NRSF	neuron-restrictive silencer factor
nt	Nukleotide
N-Terminus	Amino-Terminus einer Desoxyribonukleinsäure
O ₂ ⁻	Superoxidradikal
OD	optische Dichte
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PKC	Protein Kinase C
PKD	Protein Kinase D
PMSF	Phenylmethylsulphonylfourid
Prdx	Peroxiredoxin
Prx-SH	reduzierte Form von Peroxiredoxin
PrxSO ₃	oxidierte Form von Peroxiredoxin
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
REST	RE-1-silencing transcription factor
RNA	Ribonukleisäure
RNAse H1	Ribonuklease Typ H1
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
Rpm	Revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute
SERCA2a	Sarkoplasmatisches Retikulum Calcium ATPase 2a
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
s	Sekunde
sec	Sekunde
Sham	Kontrolle zu operierten Tieren = „Schein“-operiert
SUV39H1	Histone-lysine N-methyltransferase SUV39H1
SRF	Serum response factor
TAC	transverse Aortenkonstriktion
TAE	Tris-Acetat-EDTA

TBS	TRIS-buffered saline
TBS-T	TRIS-buffered saline plus Tween
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRX	Thioredoxin
TSA	Trichostatin A
Tween	ein Detergenz
U	Unit
u.a.	unter anderem
V	Volt
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel
µg	10 ⁻³ Milligramm
µl	10 ⁻³ Milliliter

1. Zusammenfassung

Bei Patienten mit Herzinsuffizienz kommt es zur Reaktivierung des fetalen Genprogrammes im Myokard, was typischerweise mit einer Erhöhung der fetalen Gene ANP und BNP einhergeht. Die Freisetzung der natriuretischen Peptide ist auf ein linksventrikuläres maladaptives kardiales Remodeling zurückzuführen, wobei der zugrundeliegende Regulationsmechanismus noch nicht vollständig entschlüsselt ist. Klar ist, dass auf epigenetischer Ebene Chromatinänderungen ablaufen, welche u.a. durch transkriptionelle Repressoren wie beispielsweise den RE-1-silencing transcription factor (REST) und durch Histondeacetylasen oder Histonacetyltransferasen reguliert werden. Diese beeinflussen die Chromatin-Konformation und ermöglichen oder verwehren somit die Zugänglichkeit von modulierenden Transkriptionsfaktoren an die DNA.

Wir haben in humanem und murinem linksventrikulären Myokard die Regulation des Transkriptionsfaktors REST und der Histondeacetylase 4 (HDAC4), die als Repressoren der fetalen Geneexpression fungieren, untersucht. Meine Analysen in humanen herzinsuffizienten Geweben zeigen, dass weder die Protein Expression des Repressors REST reguliert ist noch eine verminderte Rekrutierung von REST an die Promoterregionen von ANP und BNP stattfindet. Auch konnte keine Translokationsänderung von REST festgestellt werden. In murinen LV Myokardgewebe hingegen zeigte HDAC4 nach TAC-OP einen erhöhten Export aus dem Nukleus, welcher mit einer erhöhten Genexpression von ANP und BNP einhergeht. Darüber hinaus wurde in meiner Arbeit der Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und kurzzeitiger hämodynamischer Stresseinwirkungen in murinen Herzgeweben untersucht. Der Export von HDAC4 wird nicht nur durch Phosphorylierung aktiviert, sondern nach neueren Erkenntnissen anderer auch über einen oxidativen Mechanismus. Um diesen Mechanismus näher zu ergründen, setzten wir Herzen einer erhöhten Nachlast *in vivo* und *in vitro* aus bzw. exponierten sie direkt reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in einer isolierten Herzapparatur (nach Langendorff). In diesen Experimenten konnten wir jedoch keine Auswirkung von ROS oder einer kurzfristigen Erhöhung der Nachlast auf den Oxidationsstatus von HDAC4 erkennen. Unsere Ergebnisse lassen keinen Zusammenhang zwischen oxidativer Stresseinwirkung und HDAC4-Regulation erkennen, da einerseits keine Änderung der

HDAC4-Translokation bzw. keine Heraufregulation der fetalen Gene ANP und BNP nachweisbar war.

Abstract

In patients with chronic heart failure, reactivation of the fetal gene program is accompanied by an increase of atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP) and is a hallmark of maladaptive LV remodeling. However, the mechanisms which govern this reactivation are incompletely understood. Histone deacetylases (HDACs) and histone acetyltransferases (HATs) modify the conformation of chromatin, which affects the accessibility of DNA for transcription factors. Using human LV myocardium, we found that the upregulation of ANP and BNP, which are indicators of a reactivated fetal gene program in failing hearts, does not depend on the recruitment of RE-1-silencing transcription factor (REST) on their promoter regions. In addition, we demonstrated that REST remains in the nucleus and is not translocated to the cytosol in failing hearts.

In contrast, histone deacetylase 4 (HDAC4) seems to play an important role in the development of chronic heart failure. In mice undergoing transverse aortic constriction (TAC), we measured an increase of nuclear export of HDAC4 in LV myocardial tissue, which correlated with the upregulation of ANP and BNP. Translocation of HDAC4 is not only regulated by phosphorylation, but also by oxidative mechanisms. We examined the role of reactive oxygen species (ROS) for HDAC4 regulation in an acute stress model. In this respect, we analyzed the influence of ROS and short-time hemodynamic stress on murine myocardium. In both, isolated murine working hearts exposed to acute changes in afterload and hearts perfused with hydrogen peroxide in the Langendorff system, no acute effects on HDAC4 translocation and ANP and BNP gene expression were observed. In conclusion, HDAC4 may play an important role in the signaling events associated with the development of chronic heart failure, however, not in the effects of acute hemodynamic or oxidative stress on the myocardium.

2. Einleitung

2.1 Definition der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz stellt eine chronische, unheilbare Erkrankung mit häufig infauster Prognose dar, an der jährlich über 40.000 Menschen sterben (*Bundesamt für Statistik, 2011*). Die Herzinsuffizienz ist derzeit der häufigste Grund für eine Krankenhauseinweisung in Deutschland (*Dtsch Ärztebl Int, 2009*). Sie ist definiert als eine strukturelle oder funktionelle Veränderung des Herzens, welches in der Folge die peripheren Organe und Gewebe nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgen kann (*WHO*). Etwa 1-2% der Bevölkerung in den Industrienationen ist betroffen, wobei die Prävalenz bei über 70-jährigen auf bis zu 10% steigt (*Mosterd A und Hoes AW, 2007*). Die Ätiologie ist breit gefächert, aber in 50% der Fälle liegt die Ursache in der arteriellen Hypertonie (*Framingham-Studie*), dabei besteht zumeist die pathogenetische Sequenz:

Hypertonie → Koronare Herzkrankheit (KHK) → Herzinfarkt → Herzinsuffizienz

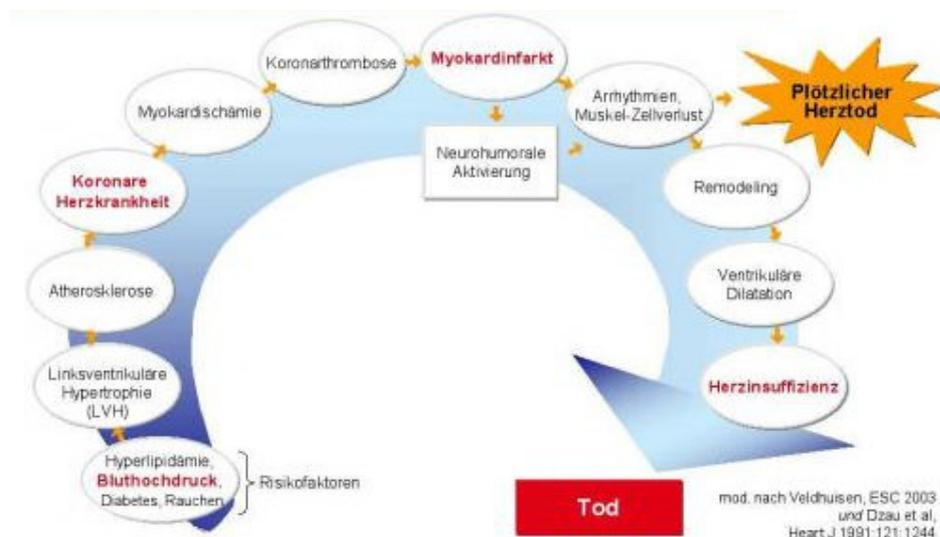


Abb. 1: Das kardiovaskuläre Kontinuum: Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Rauchen, Hyperlipidämie und Diabetes stoßen den circulus vitiosus an. Schon hier sollte mit einer „Lifestyle“ Korrektur oder medikamentösen Therapie begonnen werden, sonst entstehen Atherosklerose und koronare Herzerkrankung, welche im schlimmsten Fall zum Myokardinfarkt führt, was in der Folge eine neuroendokrine Aktivierung verursacht. Entweder kann es hier schon zum plötzlichen Herztod kommen oder kardiale Umbauprozesse (sog. Remodeling) münden in einer Herzinsuffizienz, welche trotz einer optimalen Therapie mit einer schlechten Prognose einhergeht.

Folglich zählen Hypertonie und KHK zu den häufigsten Ursachen der Entstehung der Herzinsuffizienz, weitere sind Kardiomyopathien, Myokarditiden, Vitien, konstriktive Perikarditiden und Herzbeuteltamponade. Diese unterschiedlichen Erkrankungen münden alle in eine gemeinsame Endstrecke, der Herzinsuffizienz, sie variiert jedoch in ihren pathophysiologischen Erscheinungsbildern. Einerseits gibt es die systolischen Ventrikelfunktionsstörungen, welche durch Kontraktionsschwäche oder erhöhte Ventrikelwandspannung (Erhöhung des Preloads= Volumenbelastung oder Erhöhung des Afterloads= Druckbelastung) gekennzeichnet sind, dafür sind z.B. KHK oder arterielle Hypertonie verantwortlich. Andererseits gibt es die diastolischen Ventrikelfunktionsstörungen, die sich durch Herzhypertrophie oder eingeschränkte Ventrikelfüllung z.B. als Folge einer arteriellen Hypertonie, aber auch (in selteneren Fällen) auf dem Boden einer restriktiven Kardiomyopathie ausbilden können. Schließlich sind brady- oder tachykarde Herzrhythmusstörungen, welche unterschiedlicher Ätiologie sein können, eine der wichtigsten pathophysiologischen Veränderungen bei der Herzinsuffizienz oder, wie zum Beispiel bei der Tachykardiomyopathie, auch Ursache der Herzmuskelschädigung.

Die klinischen Symptome können je nachdem, ob eine Links- oder Rechtsherzinsuffizienz führend ist, unterschiedlich ausfallen. Während sich die Linksherzinsuffizienz durch Symptome wie belastungsabhängige Luftnot, Lungenödem oder Orthopnoe (Unfähigkeit flach zu liegen) auszeichnet, macht sich die Rechtsherzinsuffizienz durch einen Volumen-Rückstau in das venöse System bemerkbar, wie Gewichtszunahme und Beinödeme (v.a. an den Knöcheln/ Unterschenkeln). Typische Zeichen dafür sind Jugularis- oder Lebervenenstauung. Zu den häufigsten Komplikationen gehören lebensgefährliche ventrikuläre Rhythmusstörungen oder akute kardiale Dekompensationen, diese Patienten erliegen meist dem plötzlichen Herztod. Gleichsam stellen ventrikuläre Rhythmusstörungen die häufigste Todesursache bei der chronischen Herzinsuffizienz dar.

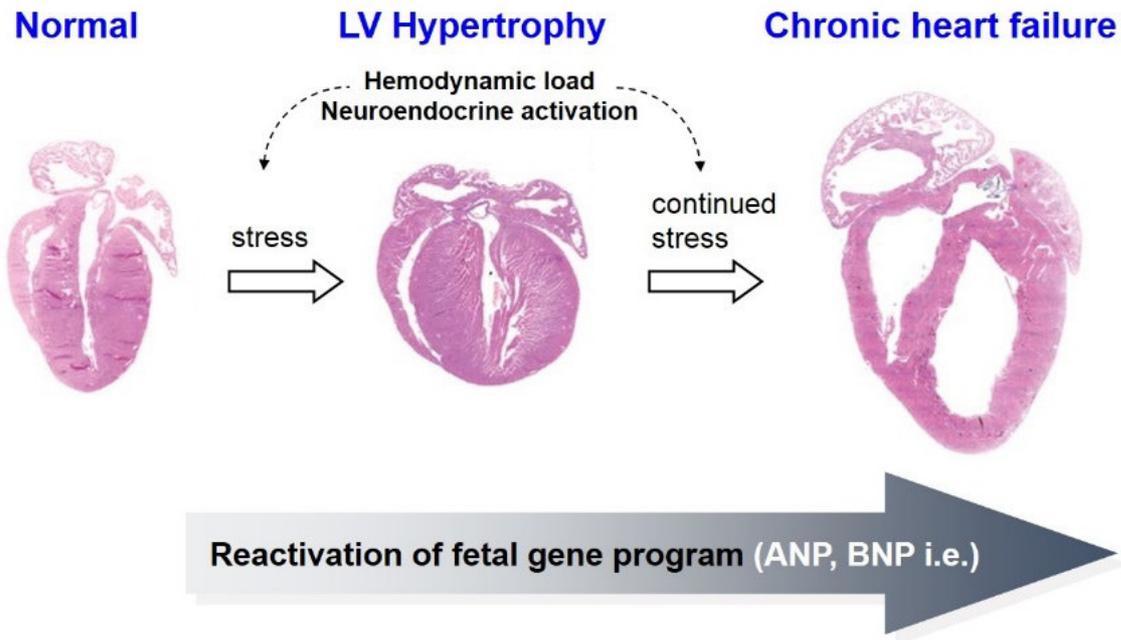
Bekanntere Kompensationsmechanismen der Herzinsuffizienz sind zum einen die neuroendokrine Aktivierung, wozu die Aktivierung des Sympathikus, Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, Vasopressin und Freisetzung natriuretischer Peptide wie ANP und BNP zählen, auf der anderen Seite entwickeln Herzzellen

strukturelle, biochemische und elektrophysiologische Veränderungen, „Remodeling“ genannt. Die myokardiale Hypertrophie wird meist als Kompensationsmechanismus angesehen, die bei Herzinsuffizienz gesteigerte transmurale Wandspannung durch Erhöhung der Wanddicke zu kompensieren. Bislang ist die aktuelle Therapie sehr begrenzt, sie umfasst 3 Säulen: die kausale, die symptomatische Säule und die Herztransplantation (*ESC Guidelines, European journal of heart failure, 2012*). Die kausale Säule umfasst im Wesentlichen die Therapie der arteriellen Hypertonie und anderer greifbarer Ursachen einer Herzinsuffizienz, wie z.B. die Operation eines Herzklappenitiums oder einer Herzbeutelamponade. Die symptomatische Säule beinhaltet mehrere Komponenten, dazu gehören Allgemeinmaßnahmen wie kardiovaskuläre Risikoreduktion, die medikamentöse Therapie mit die Prognose verbessernden Wirkstoffen wie ACE-Hemmer (ACEI), Angiotensin II-Rezeptorblocker (ARB), Betarezeptorenblocker (BB) oder Aldosteronantagonisten, darüber hinaus nicht prognoseverbessernde Medikamente wie Diuretika oder Herzglykoside. Ferner hat sich bei hochgradig eingeschränkter linksventrikulärer Pumpfunktion auch die Device-Therapie etabliert. Diese umfasst vor allem die kardiale Resynchronisationstherapie (CRT) und implantierbare Kardioverter-Defibrillator- (ICD) Therapie. Als letzte Säule und ultima ratio besteht die Möglichkeit der Herztransplantation.

Zusammenfassend ist die chronische Herzinsuffizienz eine sehr bedeutsame Krankheitsentität, ihre Komplikationen sind schwerwiegend, sie ist mit einer hohen Morbidität verbunden, die Prognose ist häufig ungünstig und die Therapiemöglichkeiten begrenzt. Gerade darum ist es so besonders wichtig, neue und effiziente Therapieansätze zur Behandlung der Herzinsuffizienz zu finden. Dazu ist es zwingend notwendig, die zugrundeliegenden biochemischen Mechanismen genau aufzuklären. Unsere Arbeitsgruppe ist besonders an epigenetischen Regulationsmechanismen im Zusammenhang mit der Entstehung der Herzinsuffizienz interessiert.

2.2 Genetische Veränderungen in herzinsuffizienten Zellen

Die Entstehung der Herzinsuffizienz ist multifaktoriell. Wie man heute weiß, spielen Genregulationsprozesse in den Herzzellen eine entscheidende Rolle bei der Transition von einem gesunden zu einem insuffizienten Myokard (*Bristow MR, 1998*). Ein Kennzeichen für molekulare Veränderungen stellt die Aktivierung des fetalen Genprogramms dar. Hierbei handelt es sich um Gene, die während der embryonalen Entwicklung der Herzen eine wichtige Rolle spielen, im gesunden adulten Herzen jedoch abgeschaltet sind. Im Zuge einer Herzinsuffizienz kommt es zu einer Dysregulation der myokardialen Genexpression, die weitreichende Folgen auf strukturelle, elektrophysiologische und biochemische Eigenschaften des Herzmuskels hat. So findet unter anderem eine Heraufregulation der natriuretischen Peptide (ANP und BNP), fetaler Ionenkanäle und fetaler kontraktiler Filamente, wie alpha Skeletal Muscle Aktin (α Ska) oder beta-Myosin-Heavy Chain statt (β -MHC). Gleichzeitig kommt es zu einer Herabregulation des adulten kontraktilen Filaments alpha-Myosin-Heavy Chain (α MHC), ein wichtiger Bestandteil des kontraktilen Herzmuskelzellapparates, und der sarkoplasmatischen Retikulum Calcium ATPase 2a (SERCA2a). Die Herabregulation dieser Gene hat direkte negative Auswirkungen auf die Kontraktionskraft des Herzens (*Bartunek J et al., 2008; Nakao K et al., 1997; Lowes BD et al., 1997*). Die natriuretischen Peptide entstehen in den myoendokrinen Zellen der Vorhöfe und Ventrikeln nach hämodynamischer Stresseinwirkung auf die Herzzellen und sind dabei zum einen als Produkt neuroendokrinen Remodelings, zum anderen als Produkt der Herzhypertrophie anzusehen (*Wiese S et al., 2000*). Sie spielen im klinischen Alltag eine wichtige Rolle, da sie als Biomarker für den Nachweis, den Schweregrad und die Prognose einer Herzerkrankung dienen.



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Abb. 2: Aktivierung des fetalen Genprogramms: andauernder Stress bewirkt eine kardiale Linksherzhypertrophie und mündet in eine chronische Herzinsuffizienz. Dieser Prozess geht mit der Reaktivierung fetaler Gene wie ANP und BNP einher.

2.3 Epigenetik und Herzinsuffizienz

Die epigenetische Regulation beinhaltet alle Mechanismen der Genregulation, die ohne Veränderungen der Nukleotidsequenz der DNA funktionieren. Es gibt 4 Hauptgruppen, die in Histonmodifikationen, microRNA-Regulation, ATP-abhängige Chromatinänderungen und DNA-Methylierung unterteilt werden können (*Papait R et al., 2013*). Im Zellkern liegt die DNA in Chromatin verpackt und um Nukleosomen gewickelt vor, wobei sich ein Nukleosom aus einem Oktamer von 4 Histonkernproteinen zusammensetzt: jeweils zwei Histon 2 a, Histon 2 b, Histon 3 und Histon 4. Histone tragen verschiedene Modifikationsbindestellen, die entweder mit einer aktiven Genexpression oder einer Genrepression assoziiert ist (*Kouzarides T, 2002*).

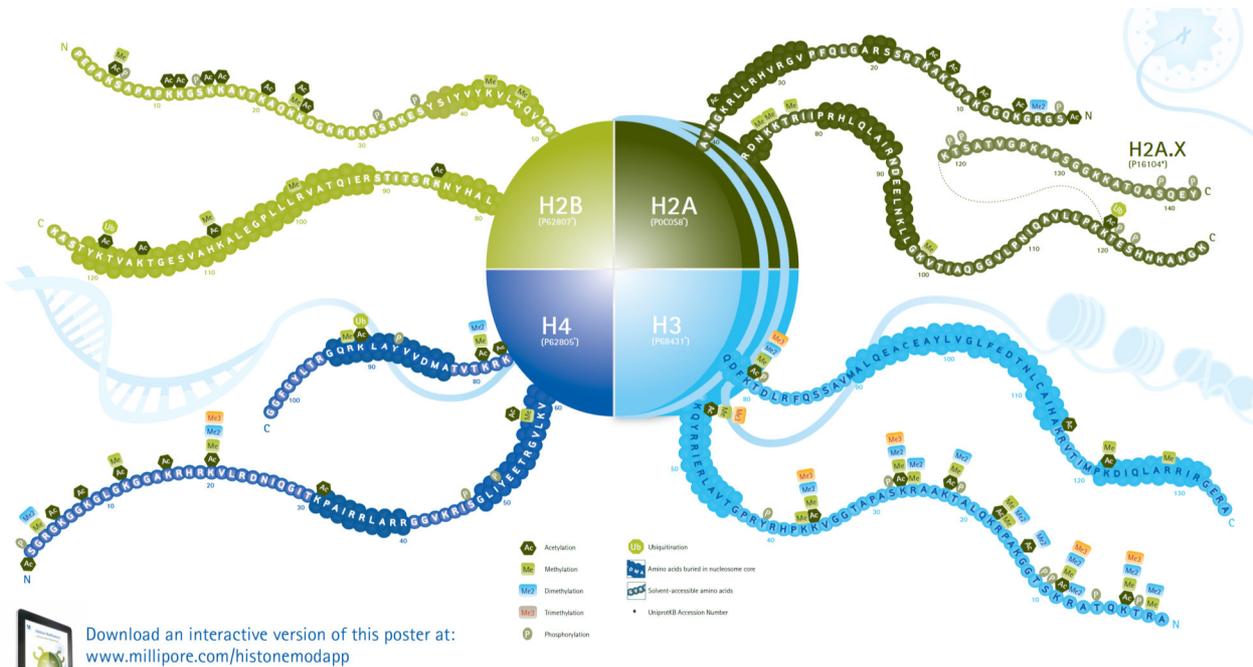
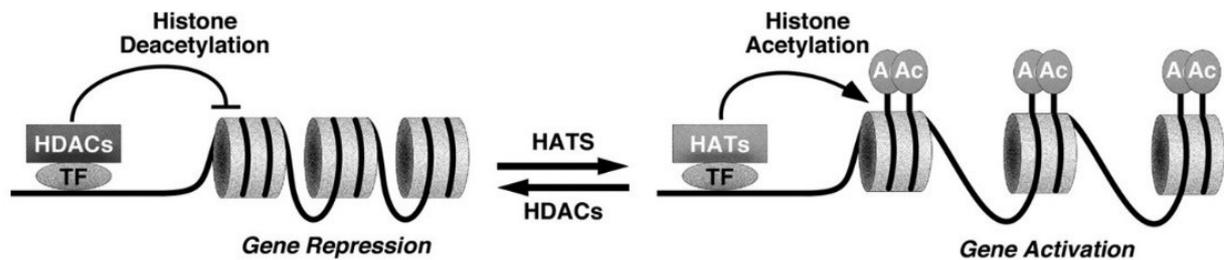


Abb. 3: Schematische Darstellung eines oktameren Nucleosomenkerns, bestehend aus 2x4 Histoneinheiten und deren verschiedenen Modifikationsbindungsstellen, um die die DNA gewunden ist. Die Histoneinheiten sind typischerweise reich an basischen Aminosäuren wie z.B. Lysin, was einen positiv geladenen Charakter verleiht und durch Einwirkung oder Binden diverser Moleküle an den Modifikationsbindungsstellen die Funktion der negativ geladenen DNA beeinflusst. Dargestellt sind hier die möglichen Modifizierungsstellen der Histone. Dabei unterscheidet man zwischen Acetylierung (Ac), Methylierung (Me), Di- (Me₂) und Trimethylierung (Me₃), Phosphorylierung (P) und Ubiquitinierung (U).

Ein wichtiger Regulator prohypertropher Gene ist die Histon-Deacetylase 4 (HDAC4). HDAC4 steuert die Aktivität seiner Zielgene entweder direkt über die Modifikation von Histon-Proteinen, kann aber auch über die Deacetylierung von Nicht-Histon-Proteinen in verschiedene Mechanismen der Zelle regulatorisch eingreifen (Minucci S, 2006). Aktuelle Studien belegen die Bedeutung von Histondeacetylasen bei der Genregulation im Hinblick auf die Entstehung der Herzinsuffizienz (Haberland M et al., 2009). Die Histonacetylierung gehört zu den wichtigen epigenetischen Regulationsmechanismen, die für die Transkription von Genen eine entscheidende Rolle haben. So veranlassen Acetylierungen an Lysinresten der Histone H2B, H3 und H4 eine Transkriptionsaktivierung, da dieser Vorgang zu einer Relaxation und zur Öffnung der Chromatinstruktur führt und somit die Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihre Zielgene ermöglicht, während hypoacetylierte Histonproteine in transkriptional inaktiven Regionen vorliegen.



Backs J , and Olson E N *Circulation Research* 2006;98:15-24



Copyright © American Heart Association

Abb. 4: **A** zeigt kondensiertes Chromatin eines hypoacetylierten Histon-Abschnittes, die Bindung von Transkriptionsfaktoren bleibt verwehrt; **B** zeigt eine geöffnete Chromatinstruktur infolge des Transfers von Acetylgruppen auf Histonproteine, Transkriptionsfaktoren können mit der DNA interagieren.

Die Acetylierung ist ein dynamischer Prozess, welcher durch zwei Enzymgruppen kontrolliert wird: den Histonacetyltransferasen (HATs) und den Histondeacetylasen (HDACs), von denen beide in mehreren Enzymklassen existieren und deren Expression und Aktivität sehr fein reguliert wird (*Wang X und Hayes JJ ,2008*). Die HATs katalysieren die Übertragung von Acetylgruppen an spezifische Lysinreste von Histonen, was zu einer Neutralisation der positiven Ladung der Histone führt. Da die DNA negativ geladen ist, kommt es zu einer Relaxation und Öffnung der Chromatinstruktur, was wiederum das Binden von Transkriptionsfaktoren an die DNA der Gene erleichtert. Die Histondeacetylasen hingegen entfernen Acetylgruppen an den für sie vorgesehenen Bindungsstellen und stärken somit eine kondensierte und feste Chromatinstruktur, was die Transkription von Genen verhindert (*Johnson CA und Turner BM, 1999*). Letztgenannter Vorgang ist gerade bei der Repression fetaler Gene unabdingbar, womit den HDACs eine wichtige Aufgabe bei der Regulation prohypertropher Gene zukommt. Die Rolle von HDACs in der Herzinsuffizienz ist noch nicht aufgeklärt und stellt daher ein wichtiges Forschungsgebiet bei der Suche nach zukünftigen Therapiezielen dar.

2.4 Die Bedeutung des RE1 Silencing Transkription Faktor (REST) im Rahmen der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist mit einer neuroendokrinen Aktivierung assoziiert und geht mit der Erhöhung von natriuretischen Peptiden wie ANP und BNP einher, wobei BNP als Biomarker schon den Einzug in die klinische Herzinsuffizienzdiagnostik gefunden hat. In einem Mausmodell wurde gezeigt, dass die Genexpression der fetalen Gene ANP und BNP durch den Transkriptionsfaktor „RE1 Silencing Transkription Faktor“ (REST) reprimiert werden (*Kuwahara K et al., 2003*). REST, auch NRSF (neuron-restrictive silencer factor) genannt, war bis dahin lediglich als Masterregulator neuronaler Gene in nicht-neuronalen Geweben bekannt (*Kraner SD et al., 1992; Schoenherr CJ und Anderson DJ, 1995*). Dort ist eines seiner Zielgene das synaptische Vesikelprotein Synapsin I (*Schoch S et al., 1996*). Die Expression von Synapsin I ist auf neuronale Zellen beschränkt, da in diesen Zellen die Konzentration des Repressors REST nur sehr gering ist. Die Expressionslevel von REST und Synapsin I stehen also in einem inversen Verhältnis. Demnach nimmt mit zunehmender Expression von REST die Transkription seiner Zielgene ab (*Lietz M et al., 1998*). Die regulatorischen Promotorbereiche der durch REST regulierten Gene enthalten eine spezifische DNA-Sequenz, die dem Repressorprotein als Bindestelle dient. Diese Nukleotidsequenz wird als NRSE (neuron restrictive silencer element) bezeichnet (*Kraner SD et al., 1992*). Das REST-Protein vermittelt seine hemmenden Eigenschaften über zwei Repressordomänen, eine am N- und eine am C-Terminus. Über diese Domänen kann REST Ko-Repressoren rekrutieren, die ihrerseits wiederum mit Histon-Deacetylasen (HDAC) interagieren, und so mit REST einen Repressorkomplex bilden (*Naruse Y et al., 1999; Huang Y et al., 1999; Andrés ME et al., 1999*).

Neueste Erkenntnisse deuten darauf hin, dass REST bei der Regulation des fetalen Genprogramms in Maus-Kardiomyozyten eine wichtige Rolle spielt (*Kuwahara K et al., 2003*). Kuwahara et al. (2003) zeigten, dass in den nicht-kodierenden Regionen der fetalen Gene ANP, BNP, α -SKA, CACNA1H, HCN2 und HCN4 ein NRSE-Sequenz lokalisiert ist, und dass deren Repression durch REST vermittelt wird. Zudem zeigte Nakagawa et al. (2006), dass die Klasse II HDACs 4 und 5 an der Regulation des fetalen Genprogramms beteiligt sind, indem sie durch den Transkriptionsfaktoren REST an die Transkriptionseinheiten der kardialen Gene rekrutiert werden und zur Reprimierung der Transkription beitragen.

Der Mechanismus, der zur Reaktivierung des fetalen Genprogramms führt, ist jedoch unbekannt. Darüber hinaus ist unklar, ob in menschlichem Myokard ein Zusammenhang zwischen der Expression des Repressors REST, seiner Kofaktoren und der Reaktivierung des fetalen Genprogramms besteht.

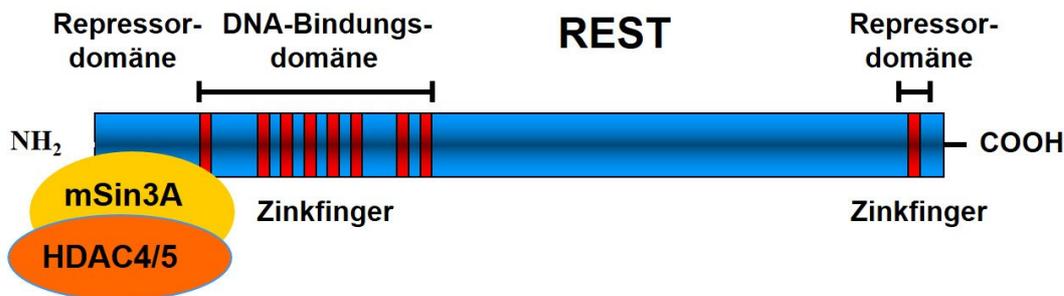


Abb. 5: Der Transkriptionsfaktor REST beinhaltet Zinkfingerstrukturen, welche spezifisch mit der DNA interagieren können. An der Repressordomäne, nahe dem N-Terminus, befindet sich der Korepressor Komplex mSin3A, mit den Bindungsstellen für HDAC 4 und 5 (modifiziert nach Thiel G).

2.5 Die Bedeutung von HDAC4 im Rahmen der Herzinsuffizienz

Die Histon Deacetylase 4 (HDAC4) gehört zur Signal-responsiven Gruppe II der Histondeacetylasen. Die Expression von HDAC4 beschränkt sich lediglich auf das Gehirn, die Skelettmuskeln und das Herz. HDAC4 ist ein bekannter Repressor des fetalen Genprogramms, welches zusammen mit Transkriptionsfaktoren wie dem Myocyte enhancer factor 2 (MEF2), dem Serum response factor (SRF) oder mit REST die Expression vieler prohypertropher Gene steuert. Im gesunden adulten Herzen liegt HDAC4 größtenteils im Nukleus, als Teil eines Multiproteinkomplexes vor. Liegt HDAC4 gebunden an MEF2 vor, wird die Transkription fetaler Gene wie ANP verhindert (Bucks J et al., 2011). MEF2 ist ein stressabhängiger Regulator der Genexpression und spielt auch eine Rolle in der Entwicklung der gestreiften Muskulatur und deren Pathogenese (Black BL und Olsen EN, 1998). MEF2 gehört zur Gruppe der MADS-Box Proteine, welche wichtig für Entwicklungsprozesse sind (Kim Y et al., 2008). Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass Mäuse, denen MEF2 fehlt, vor stressinduziertem kardialen Remodeling geschützt sind. Durch den Einfluss prohypertropher Stimuli wie Katecholamine, Angiotensin, Endothelin-1 oder chronischer beta1-Adrenozeptor-Stimulation kommt es im Herzen zu adrenerger Gq-Proteinrezeptor-Aktivierung (Adams JW et al., 1998; Carmen GY und Victor SM, 2006), wodurch die Calcium Calmodulin abhängige Kinase II (CaMKII) aktiviert wird

(Anderson ME, 2011). Die aktivierte CaMKII katalysiert die Phosphorylierung der Histondeacetylase 4 (HDAC4), was zur Folge hat, dass diese aus dem Multiproteinkomplex mit MEF2 im Nukleus gelöst und durch Binden an das Chaperonprotein 14-3-3 ins Cytosol transportiert wird (Bucks J et al., 2008). Die Repression ist somit aufgehoben und MEF2, ein Hauptregulator der Entstehung der Herzhypertrophie, kann die Expression fetaler Gene, wie u.a. ANP und BNP initiieren (Bucks J und Olson EN, 2006; Kurdi M und Booz GW, 2011).

Neuere Forschungsergebnisse beschreiben einen zusätzlichen redoxabhängigen Signalweg der Klasse II HDACs, welche die Entstehung der Herzhypertrophie zu beeinflussen vermag (Ago T et al, 2008). Die NAD(P)H Oxidasen (Nox) gehören zu den Hauptproduzenten von Superoxid Radikalen (O_2^-) und sind sowohl in physiologische als auch in pathophysiologische Mechanismen involviert. Es wurde gezeigt, dass der Redoxstatus von HDAC4 direkt über die Kernmembran-ständige Nox4 reguliert wird (Kuroda J et al., 2010; Matsushima S et al., 2013). Die prohypertrophen Signalmoleküle Angiotensin II und Phenylephrin führen binnen weniger Minuten zu einer Aktivierung von Nox4 und somit zu einer gesteigerten nukleären ROS Produktion. Dies hat zur Folge, dass HDAC4 an spezifischen Cysteinresten oxidiert und aus dem Nukleus heraustransportiert wird (Ago T et al., 2008; Block K et al., 2008; Matsushima S et al., 2013). Eine experimentelle Studie zeigte, dass Thioredoxin diesen Prozess zu verhindern vermag (Yamanoto M et al., 2003), indem es als Protein-Disulfid-Reduktase-System erfolgreich ROS abpuffert und den redoxabhängigen nukleocytoplasmischen Transport der Klasse II-HDACs, unabhängig von deren Phosphorylierungsstatus, reguliert und somit die Ausbildung einer linksventrikulären Hypertrophie (LVH) abschwächt. Ein ähnlicher Mechanismus wird durch Stickstoffmonoxid (NO) katalysiert, welches durch Scherkräfte oder hämodynamische Überlastung freigesetzt wird und als Signalmolekül ebenfalls den nukleären Export von HDAC4 bewirkt, entweder durch Phosphorylierung (Illi B et al., 2006) oder durch Oxidation (Matsushima S et al., 2013).

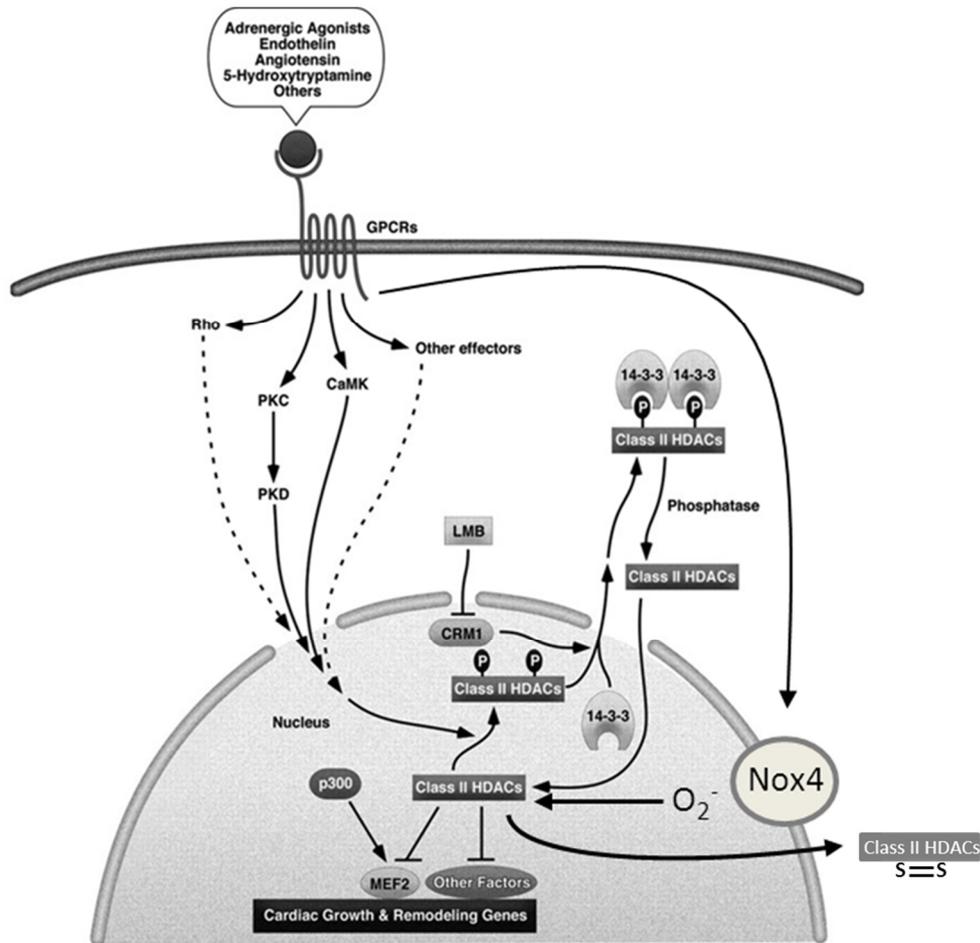


Abb. 6: Kinase-Signalweg der Klasse II HDACs. Diverse Agonisten aktivieren über G-proteingekoppelte Rezeptoren einerseits die PKC-PKD Achse, CaMK, Rho und weitere Effektoren, welche die Phosphorylierung der Klasse II HDACs veranlassen, andererseits aktivieren sie die NADPH-Oxidase 4 (NOX4), welche Superoxidanionen bilden und die Oxidation der Klasse II HDACs bewirken. Im Nucleus dissoziiert Phospho-HDAC bzw. oxidiertes HDAC von MEF2 ab und wird ins Cytoplasma abtransportiert. Der nukleäre Export induziert die Reaktivierung fetaler Gene was zur Hypertrophie des Herzens mit sukzessiv voranschreitender Herzschwäche führen kann (modifiziert nach *Backs and Olson 2006*).

2.6 Die Entstehung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind definiert als hochreaktive Sauerstoffradikale von kurzer Halbwertszeit. Sie entstehen typischerweise physiologisch bei der Zellatmung und bei Zellstress wie im Herzen bei erhöhter Arbeitslast. ROS werden in gesunden Zellen mit Hilfe der vielfältigen antioxidativen Scavengersysteme abgepuffert, so dass intakte Zellen unbeschadet bleiben. ROS haben jedoch auch eine Funktion als biologische Signalmoleküle. Stickstoffmonoxid wurde als erstes biologisch aktives Sauerstoffradikal entdeckt, heutzutage sind weitere solcher ROS

bekannt. Wasserstoffperoxid (H₂O₂) gehört zur Gruppe der ROS und stellt naturgemäß eine relativ stabile Substanz dar. Das besondere an diesem Molekül ist, dass es keine freien Elektronen besitzt und somit frei innerhalb und zwischen den Zellen diffundieren kann. Ermöglicht wird dies durch seine ungeladene, apolare Eigenschaft. Der Abbau erfolgt über die Katalase, einem überwiegend peroxisomal vorkommenden Enzym, welches praktisch in allen Zellen vertreten ist und inaktiviert das bei Oxidationsvorgängen entstehende Wasserstoffperoxid (*Chance et al., 1979; Halliwell B, 1989*): $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Ein weiteres wichtiges ubiquitär vorkommendes Radikalfängersystem stellt das Glutathionperoxidase- und Thioredoxinreduktasesystem dar, die als Reduktionsmittel Glutathion (GSH) bzw. Thioredoxin (TRX) verwenden, um verschiedene ROS zu entgiften. Dazu werden Thiolgruppen verbraucht, welche im Anschluss NADPH-abhängig wieder regeneriert werden (*Hensley K et al., 2000; Nordberg J und Arnér ES, 2001*). Bei vermehrtem Stress und Einwirken pathologischer Risikofaktoren übersteigt das Ausmaß der ROS-Bildung die antioxidative Kapazität und es entsteht „oxidativer Stress“, der sich in der Oxidation und Schädigung biologischer Moleküle äußert (*Dreher D und Junod AF, 1995; Cai H und Harrison DG, 2000; Zalba G et al., 2000*). Eine Oxidation zellulärer Proteine betrifft vorrangig die Sulfhydrylgruppen von Cysteinresten und kann über eine Konformationsänderung sowohl zu Funktionsgewinn als auch -einbuße dieser Moleküle führen. Zellen besitzen jedoch die Fähigkeit, ROS kontrolliert zu bilden und gezielt als biologische Stimuli einzusetzen (*Allen RG und Tresini M, 2000*). Ein weiterer wichtiger Regulator ist Peroxiredoxin. Peroxiredoxine (Prdx) gehören zu einer großen Gruppe von antioxidativ wirkenden Enzymen. Sie weisen vielfältige Funktionen wie Chaperon- und Peroxidase-Funktion auf und spielen eine wichtige Rolle in Redoxvorgängen (*Kang SW et al., 2005; Wood ZA et al., 2005*). Sie sind in großer Zahl in Herzzellen nachzuweisen, bislang ist jedoch wenig über ihre Funktion im Zusammenhang mit oxidativem Stress im Herzen bekannt. Studien legen nahe, dass Prdx im Herzen und Gefäßsystem eine cytoprotektive Funktion haben könnten (*Schröder E et al, 2008*).

In dieser Arbeit wurde die oxidierte Form von Peroxiredoxin (PrxSO₃) als Marker für den Redoxstatus der Herzzellen gemessen. Reduziertes Peroxiredoxin (Prx-SH) bindet H₂O₂ an seine freien Disulfidbrücken und geht in einen oxidierten Zustand über

(Prx-SO₃). Oxidiertes Peroxiredoxin weist ein höheres Molekulargewicht auf, was vermuten lässt, dass Multiproteinkomplexe bei der Prdx-vermittelten Oxidation und dem Disulfid-Austausch beteiligt sind (*Jarvis RM et al., 2012*). Es ist bekannt, dass ROS in vielen wesentlichen zellulären Signalwegen, Prozessen und Ereignissen modulierend eingreifen. Dazu zählen unter anderen die Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Transformation, Seneszenz, und Stressantwort als wichtigste Einflussbereiche von ROS (*Lander HM et al., 1997; Finkel T., 1999; Matés JM et al., 1999; Allen RG und Tresini M, 2000; Hensley K et al., 2000*).

2.7 Die Rolle von ROS im Rahmen der Herzinsuffizienz

ROS spielen eine wichtige Rolle beim Prozess der Herzhypertrophie, ausgelöst durch hämodynamische Belastung (*Sugden PH und Clerk A, 2006*). *In-vitro*- und Tierversuch-Studien belegen die Aktivierung von ROS im kardiovaskulären System als Antwort auf verschiedene Stressoren und bei Herzschwäche (*Ide T et al., 1999; Sawyer DB et al., 2002*). Sie entstehen zum einen als Folge von zellulärem Stress, wie erhöhter Arbeitslast im Herzen, zum anderen als Resultat alpha-adrenerger Stimulation, was zur Myokardhypertrophie führt, und beta-adrenerger Stimulation, was zur Apoptose führt (*Remondino A et al, 2003*). Zudem entstehen ROS als Nebenprodukt bei der aeroben Zellatmung in den Mitochondrien (*Miwa S und Brand MD, 2003*), welche in gesunden Zellen durch diverse Antioxidantien, wie Glutathion, Peroxiredoxin oder Superoxiddismutase abgepuffert werden (*Sawyer DB et al., 2002*). Kippt das komplexe Gleichgewicht zugunsten einer übermäßigen ROS-Produktion, greifen ROS in zelluläre Signalwege ein und führen dann über die Oxidation von Biomolekülen, Chromatinveränderungen und Aktivierung oder Hemmung von Transkriptionsfaktoren zur Entstehung von Herzhypertrophie. Wenn die Kompensation des Herzmuskels in Form von Hypertrophie nicht ausreicht bzw. schädigende Noxen für das Herz weiterhin bestehen, wird das Myokard insuffizient und es entsteht der Teufelskreis der Herzinsuffizienz. Die pathogenetische Entwicklung, ausgehend von den Risikofaktoren bis hin zur Entstehung der chronischen Herzinsuffizienz, kann in Form eines kardiovaskulären Kontinuums verstanden werden.

Von besonderem Interesse ist für uns die Rolle von ROS bei der Entstehung der Herzinsuffizienz. Experimentelle und klinische Studien belegen eine beträchtlich erhöhte Bildung von oxidativem Stress in herzinsuffizienten Zellen, einhergehend mit einer erhöhten ROS-Produktion (*Belch JJ et al., 1991; Hill MF und Singal PK., 1996;*

Mallat Z et al., 1998). Klassischerweise führen freie Radikal-induzierte Oxidationen und Zellschädigungen zu Apoptose oder Nekrose. Diese Vorgänge sind nicht mehr als einzige Pathomechanismen durch ROS zu betrachten, denn offensichtlich gibt es konzentrationsabhängige Wirkungen von H_2O_2 . Dabei führen hohe Konzentrationen eher zu den oben genannten Pathomechanismen, wohingegen sie in niedrigen Konzentrationen als Signalmoleküle in Redoxregulationen eine wichtige Rolle spielen, dem sogenannten Redox-Signalling (*Chen K und Keane JF Jr. 2012; Kwon SH et al., 2003*). Die Quellen von ROS sind vielfältig und wird in Abb. 7 vereinfacht dargestellt.

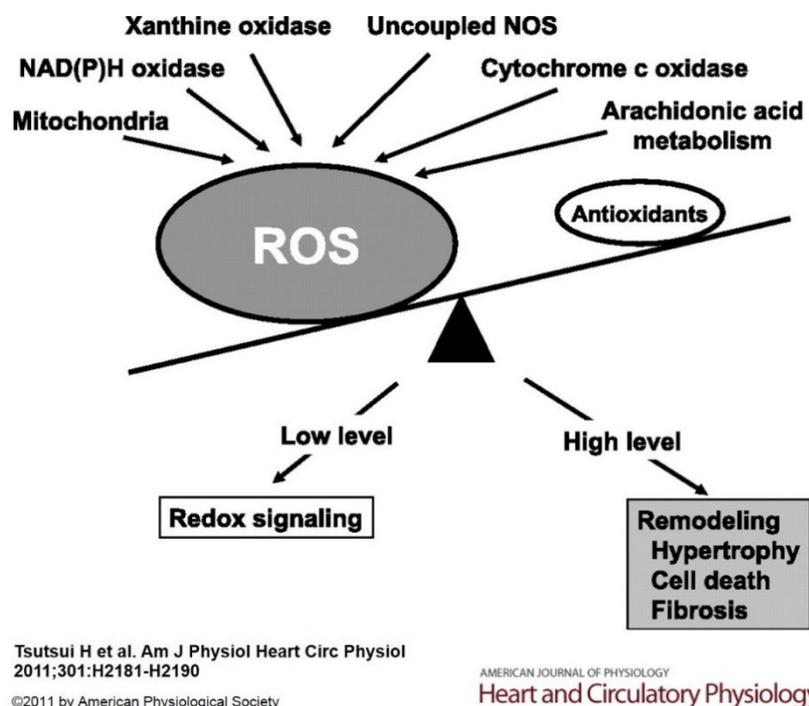


Abb. 7: Enzymatische Ursprünge von ROS und ihre pathophysiologische Rolle

ROS stammen aus verschiedenen enzymatischen Zellreaktionen wie (von links nach rechts betrachtet) aus den Mitochondrien, der NADPH-Oxidase, Xanthinoxidase, freien NO-Synthasen (NOS), Cytochrom C Oxidasen oder aus dem Fettsäuremetabolismus, wie von Arachnoidalsäuren. In gesunden Zellen stehen ROS und Antioxidantien im Gleichgewicht, wenn jedoch die Menge an ROS stark zunimmt und das Gleichgewicht, wie im Bild angedeutet, zugunsten der reaktiven Sauerstoffspezies verschoben ist, folgen konzentrationsabhängige pathophysiologische Mechanismen. In geringen Mengen (low level) wirken sie als hochspezifische Signalmoleküle im Redox-Signalling, wobei sowohl zell-protective als auch -schädigende Wirkungen beschrieben wurden. In hohen Konzentrationen (high level) kommt es hingegen zu Remodelingprozessen, Zellhypertrophie, Zelltod, durch Apoptose oder Nekrose, oder zum fibrotischen Umbau.

2.8 Fragestellung dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten regulatorische Proteine und Prozesse untersucht werden, die an Histonmodifikationen beteiligt sind, die im Kontext mit der Entstehung der Herzinsuffizienz stehen. Dabei konzentrierten wir uns, als ersten Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit, auf die Rolle von REST und HDAC4 im insuffizienten Myokard und deren Rolle bei der Reaktivierung des fetalen Genprogramms. Zum einen stellten wir uns die Frage, ob deren Expression und Lokalisation (nukleär versus cytosolisch) in Herzen von Patienten mit Herzinsuffizienz verändert ist. Der Reaktivierungsmechanismus des fetalen Genprogramms durch HDAC4 wurde detailliert in unserer Arbeitsgruppe untersucht („HDAC4 controls histone methylation in response to elevated cardiac load“, Hohl et al, JCI 2013). Noch nicht geklärt ist die Regulation von HDAC4 unter Einwirkung von oxidativen Stress im Herzen. Neue Forschungsergebnisse zeigen neben der Phosphorylierung einen redoxregulativen Einfluss durch ROS, welcher eine Oxidation von HDAC4 bewirken soll (Ago et al., Cell 2008). Aus diesem Grunde wurde die Rolle von ROS für epigenetische Prozesse, insbesondere der HDAC4 Lokalisation, bei der Entstehung der Herzinsuffizienz näher ergründet, was daher die zweite Hauptfragestellung dieser Arbeit darstellt. Dazu induzierten wir auf verschiedene Art und Weise Stress in Mäuseherzgeweben und analysierten den Oxidationsstatus von HDAC4, indem wir die zelluläre Lokalisation von HDAC4 und das Genexpressionsprofil der fetalen Gene ANP und BNP bestimmten.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

Zellen/Gewebe

C57/Bl 6N –Mäuse (Charles River)

Nierenzellen (293T) als Positivkontrolle für REST-reiche Zellen

SHSY-5Y = Neuroblastomzellen als Negativkontrolle für REST-arme Zellen

Humane Spenderherzen

Bei den hier verwendeten humanen Gewebeproben handelt es sich entweder um linksventrikuläres Myokard von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz basierend auf einer ischämischen (ICM) bzw. dilatativen Kardiomyopathie oder um gesunde, nicht verwendete Spenderherzen, (non failing =NF), da diese aufgrund von ABO-Mismatch nicht zu Transplantationszwecken verwendet werden konnten. Bei den ischämischen und dilatativen Myokardgeweben wurden die Merkmale der Herzinsuffizienz laut der WHO-Definition beachtet und in der vorliegenden Arbeit als F-Gruppe (F = failing) zusammengefasst. In folgender Tabelle finden sich nähere Angaben zu den Proben:

	NF	ICM	DCM
Anzahl der Patienten	8	8	8
Geschlecht			
weiblich	3	-	4
männlich	5	8	4
Alter in Jahren	32-69	52-60	27-64
Medikation			
ACE-I/ AT ₁ - Antagonisten		100%	50%
Betablocker		75%	50%
Aldosteron- Antagonisten		50%	75%
Digitalis		100%	15%
Diuretika		75%	100%
Inotropika		0%	100%
Nitrate		50%	0%
Statine		75%	0%

3.2 Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)

Der ChIP Assay ist eine aufwendige Methode, bei der eine Momentaufnahme der Interaktion zwischen DNA und ihren gebundenen Proteinen festgehalten wird. Das Prinzip liegt darin, die DNA-Proteinverbindungen im linksventrikulären Myokard zu fixieren und mit dem durch Ultraschall zerkleinertem Chromatin eine Antigen-Antikörperreaktion (=Immunopräzipitation) mit spezifischen Antikörper gegen DNA-gebundene Proteine durchzuführen. Das Immunopräzipitat bestehend aus DNA, dem daran gebundenem Protein und entsprechendem Antikörper wird in mehreren Schritten so aufbereitet, dass die gewonnene genomische DNA-Sequenz mit molekularbiologischen Methoden wie der PCR untersucht werden kann.

Protokoll:

Unter Zugabe von flüssigem Stickstoff werden Gewebeproben vom linksventrikulären Myokard in einem Mörser zerrieben. Anschließend überführt man das Pulver in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, versetzt es mit 1 ml eiskaltem PBS und 27,2 µl Formaldehyd (37%, Sigma) und inkubiert auf einem Überkopf-Rotator (VWR) für 20 min bei RT. Formaldehyd dient hier der Fixierung von DNA an Histone und anderen DNA-bindende Proteinen, auch „crosslinking“ genannt. Diese Reaktion wird durch Zugabe von 250 µl kaltem 1 M Glycin gestoppt und erneut auf dem Überkopf-Rotator bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Anschließend wird zweimal mit 9000rpm für 2 min zentrifugiert und das entstandene Zellpellet mit 1 ml eiskaltem 1x PBS gewaschen. Danach wird das Zellpellet in 1 ml Zelllysis-Puffer, 50 µl Protease- Inhibitor (Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail von Roche, Cat. 1187358000120) aufgenommen und für 10 min auf Eis lysiert. Im nächsten Schritt wird das in der Suspension enthaltene Chromatin mittels Ultraschall (Branson Sonifier) zerkleinert. Dazu wird die Probe mindestens 10-mal für 30 s (Einstellungen: 30% Duty cycle und Output 3) den Ultraschallpulsen ausgesetzt, um eine DNA- Fragmentlänge von ca. 600 bp zu erreichen. Anschließend werden die Zellfragmente in einer Kühlzentrifuge bei 4°C für 10 min. und 13000 rpm gefällt und der komplette Überstand in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert. 200 µl dieses Überstandes werden in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 1 ml Chip-Puffer 1:5 verdünnt, der Rest des Überstandes wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C für weitere Versuche aufbewahrt. Nun folgt das sogenannte „preclearing“. Hierbei wird die

verdünnte Probe mit 40 µl Protein-A/G-Agarose-beads (Calbiochem, Cat. IP10) versetzt und bei 4°C für 2 h vorgereinigt. Dies bewirkt, dass Proteine, die unspezifisch an die Agarosebeads binden, ausgefällt werden. Danach wird die Probe für 5 min bei 3000rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Davon werden 200 µl als Inputkontrolle zurückgehalten, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zu einem späteren Zeitpunkt des Versuches aufbewahrt. Der restliche Überstand wird in je 200 µl Aliquots aufgeteilt und in eines davon 4 µg anti-REST (Upstate, Cat. 07-579) zugegeben. In die Negativ-Kontrolle, die sogenannte „no Antibody control“ (=noAB), werden unspezifisch bindende Maus IgGs (Santa Cruz, Cat. Sc 2025) hinzupipettiert. Ab diesem Schritt erfolgt die eigentliche Immunopräzipitation. Dabei inkubieren die Proben über Nacht bei 4°C auf einem Überkopf-Rotator.

Am nächsten Morgen werden den Proben 30 µl Protein A/G-Agarosebeads hinzugegeben und bei 4°C für weitere 3 h auf dem Überkopf-Rotator inkubiert. In dieser Zeit binden die Antikörper an die Agarosebeads. Nach dieser Inkubationszeit folgt die Reinigung der Immunopräzipitate. Dabei wird wiederholt mit verschiedenen Waschpuffern steigender Stringenz jeweils 5 min mit 3000rpm bei 4°C in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert und danach der Überstand vorsichtig abgezogen. Begonnen wird mit 1 ml low-salt-wash-Puffer, dieser Schritt wird 3-mal wiederholt. Darauf folgt ein Waschschrift mit 1 ml high-salt-wash-Puffer, ein weiterer mit 1 ml Li²⁺-wash-Puffer und schließlich 2-mal mit 1 ml TE-Puffer. Nach der letzten Zentrifugation wird der TE-Puffer über dem Pellet entfernt und die restliche Flüssigkeit aus dem Pellet mit einer Spritze abgezogen. Nun folgt die Elution, hierbei werden die Immunkomplexe von den Beads gelöst. Auf das Pellet werden 250 µl frisch angesetzter Elutionspuffer gegeben und auf dem Überkopf-Rotator bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Im Anschluss zentrifugiert man für 5 min bei 3000 rpm und bringt den Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß. Die Beads werden nochmals mit 250 µl Elutionspuffer versetzt um die verbleibenden gebundenen Komplexe zu lösen. Wiederholt wird zentrifugiert und dieser Überstand zu dem bereits abgenommenen zugegeben. Als nächster Schritt folgt ein RNase-Verdau, wobei allen Proben, auch den Input-Kontrollen, 1 µl RNase H (20 mg/ml von Invitrogen, Cat. 18021-014) und 20 µl 5 M NaCl hinzupipettiert werden. Dieser Ansatz inkubiert für 5 h bei 65°C auf einem

Heizblock (Eppendorf). Danach werden die Proben unter Zugabe von 1 ml Ethanol (Merck) bei -80°C über Nacht gefällt.

Am nächsten Tag wird für 10 min mit 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert, der Alkohol entfernt und das trockene Pellet in 100 µl H₂O a.d. gelöst. Um anschließend die Freisetzung der Nukleinsäuren von den Histonen zu erreichen, müssen die Proteine durch die Endo- und Exopeptidase Proteinase K gespalten werden. Dazu werden 10 µl 0,5 M EDTA, 20 µl 1M Tris (pH=6,5) und 2 µl Proteinase K (20 mg/ml, Invitrogen, Cat. 25530-049) hinzupipettiert und für 1 h bei 65°C in den Heizblock gestellt. Als letzter Schritt folgt eine Aufreinigung der ungebunden vorliegenden DNA-Stränge mit einem DNA-Purification-Kit (Qiagen, Cat. 28106). Dafür werden die Proben mit 500 µl PB-Puffer versetzt und der pH-Wert, wenn nötig mit 10 µl 3M NaAc (pH=5,5), eingestellt. Nun können die Proben in eine Aufreinigungssäule überführt werden, um dann mit 13000 rpm für eine Minute zentrifugiert zu werden. Der Puffer im Auffangreservoir wird verworfen, in der Säule befindet sich eine Membran, an der die genomische DNA bindet. Nun gibt man 750 µl PE-Puffer auf die Säule, dieser entfernt zum Beispiel störende Salze, er wird mit 13000rpm für 1 min abzentrifugiert. Der Puffer aus dem Reservoir wird verworfen und man zentrifugiert nochmals um die Säule zu trocknen. Diese wird in ein neues Eppendorfgefäß gestellt und mit 50 µl H₂O a.d. beträufelt und wieder mit 13000 rpm für 1 min zentrifugiert. Diesen Vorgang wiederholt man noch einmal mit weiteren 50 µl H₂O a.d. Die so gewonnene genomische DNA kann nun für weitere Versuche bei -20°C aufbewahrt werden.

Puffer

<u>Zellysepuffer:</u>	5 mM	Pipes (KOH) pH 8,0
	85 mM	KCl
	0,5 %	NP-40

<u>ChIP Puffer:</u>	0,01 %	SDS
	1,1 %	Triton X-100
	1,2 mM	EDTA
	16,7 mM	Tris pH 8,1

	167 mM	NaCl
<u>Low-salt-wash Puffer:</u>	0,1 %	SDS
	1 %	Triton X-100
	2 mM	EDTA
	20 mM	Tris pH 8,1
	150 mM	NaCl
<u>High-salt-wash Puffer:</u>	0,1 %	SDS
	1 %	Triton X-100
	2 mM	EDTA
	20 mM	Tris pH 8,1
	500 mM	NaCl
<u>Li-wash Puffer:</u>	0,25 M	LiCl
	1 %	NP-40
	1 mM	EDTA
	10 mM	Tris pH 8,0
<u>TE Puffer:</u>	1 mM	EDTA
	10 mM	Tris pH 8,0
<u>Elutionspuffer:</u>	1 %	SDS
	0,1 M	NaHCO ₃

3.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde in den frühen 80er Jahren von dem Biochemiker Dr. Kary Mullis erfunden, wofür der Forscher 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde. Die Idee dieser Methode besteht darin, Nukleotidsequenzen in vitro zu vervielfältigen, um diese anschließend molekularbiologisch analysieren zu können. Das Testprinzip setzt sich aus drei aufeinanderfolgenden Schritten zusammen, die in der Einheit einen Zyklus ergeben: 1. der Denaturierung, 2. dem Annealing und 3. der Elongation. Bei der Denaturierung wird die DNA unter Hitzeeinwirkung entwunden, wodurch Einzelstränge entstehen, an denen im folgenden Annealing zwei komplementäre kurze Basensequenzen, genannt Primer, jeweils an den beiden 3'-Enden binden, damit sich schließlich bei der Elongation eine thermostabile Polymerase (Taq Polymerase) an die DNA-Primer-Hybride anlagern kann. Bei diesem letzten Schritt werden Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) unter Abspaltung von einem Diphosphat verbraucht. Die Synthese verläuft von 3' in 5' Richtung, so ist es möglich, selektiv die Sequenz zwischen den Primern zu vervielfältigen. Es entstehen zwei neue DNA-Doppelstränge. Durch mehrfache Wiederholungen dieser Reaktionszyklen in einem Thermocycler steigt die Menge der DNA- Sequenz zwischen den Primersequenzen exponentiell an.

Das Thermocyclerprogramm lautet wie folgt:

Bezeichnung	Temperatur in °C	Zeit
Initiale Denaturierung	95	5 min
Denaturierung	95	45s
Primer-Annealing	Tm-5	45s
Polymerisation	72	45s
Storage	8	unendlich

Um eine adäquate Menge an DNA zu erhaltenen wurden diese Schritte 28-mal für die GAPDH und 34-mal für die ANP-Promotorregionen und BNP-Promotorregionen wiederholt.

PCR-Protokoll für einen Mastermix-Ansatz:

Substanz	Menge in μl
10x Reaktionspuffer (Peqlab, Cat. 01-1030)	2,0
Primer Forward (10 μmol)	2,0
Primer Reverse (10 μmol)	2,0
dNTP-Mix (10 mM, Peqlab, Cat. 20-3010)	0,5
Taq-DNA-Polymerase (5 U/ μl , Peqlab, Cat. 01-1020)	0,25
Template DNA	2,0
Steriles dest. H ₂ O	11,25
Volumen Total	20,0

Forward and reverse Primer von 5' Promoterregionen für Gene des ChIP-Assays (human)

Gene (human)	Forward Primer	Reverse Primer
ANP -REST <i>bindend</i>	GAT AAC AGC CAG GGA GGA CA	ATC ACA ACT CCA TGG CAA CA
BNP -REST <i>bindend</i>	CCT GAA AAT CCC GTT GAA GA	TGA CTC ACA GCG AAA ACA GC
GAPDH	CCC AAA GTC CTC CTG TTT CA	GTC TTG AGG CCT GAG CTA CG

3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Mit einem Agarosegel werden Nukleotidsequenzen nach ihrer Basenpaargröße aufgetrennt. Dabei wandern, unter Anlegung von elektrischer Spannung, die negativ geladenen DNA-Fragmente entlang ihres elektrischen Gradienten von der negativ geladenen Kathode zur positiv geladenen Anode. Diesen Vorgang bezeichnet man als Elektrophorese. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit proportional zur Spannung im Elektrophoresebad. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird zusätzlich durch weitere Faktoren beeinflusst wie durch die Nukleotidfragmentlänge, der Agarose-Konzentration des Gels und dem pH-Wert. Abhängig von der Agarosekonzentration können Sequenzen von 0,1- 60 kb aufgetrennt werden. Die Nukleinsäuren werden

mittels Ethidiumbromid, einer interkalierenden Substanz, im UV-Licht (bei 254, 302 oder 366 nm Wellenlänge) sichtbar gemacht.

Agarose- Gelelektrophorese Protokoll:

Um ein 1,5% Agarosegel herzustellen, löst man 1,5 g Universalagarose (Peqlab) in 100 ml 1x TAE- Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle bis die Lösung homogen ist. Nach dem Abkühlen auf ca. 40 C° pipettiert man dem Gel 2 µl Ethidiumbromid unter dem Abzug hinzu. Anschließend wird das warme Gel in eine Gelkammer (Biorad) gegossen. Damit man Aussparungen zum Beladen des Gels mit den Proben erhält, wird ein taschenformender Kamm (Biorad) in das noch flüssige Gel gesteckt und wird wieder gezogen sobald das Gel fest ist. Das Agarosegel wird dann in eine Elektrophoresekammer (Biorad) gestellt, gefüllt mit 1xTAE-Puffer, welcher als elektrischer Leiter dient. Als Größenstandard wird ein 1 kb Ladder (Invitrogen, Cat. 10787-018) verwendet. Wenn die Taschen mit den Proben beladen sind, wird eine Spannung von 100 V angelegt. Die Gelelektrophorese läuft etwa 30 min. Zur Gel-Dokumentation benutzen wir eine UV-Licht-Kamera, mit der wir im Anschluss das Gel mit den aufgetrennten Banden fotografierten um sie als .tiff Datei zu archivieren. In dem Auswertungsprogramm „Labworks“ wurde schließlich die Leuchtintensität (IOD= Intensity of optical density) der Banden densitometrisch quantifiziert. Nun können diese Daten statistisch verwertet werden. Dazu wurden die Daten in eine Exceltabelle übertragen, wo wir das Verhältnis der jeweiligen Antikörperfraktion zum Input gebildet haben. Im Ergebnisteil befinden sich die ausgewerteten Verhältnisse.

3.5 RNA-Isolation und RNA-Messung

Hinter der RNA-Isolationmethode steckt eine sogenannte Phasen-Extraktion. Dabei macht man sich die unterschiedlichen Löslichkeitseigenschaften von Substanzen zu Nutze, um diese aufzutrennen und zu gewinnen. Unser Ziel ist es, RNA zu gewinnen. Diese kann dann im Anschluss mittels einer Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Das Prinzip der RNA-Isolation ist es, mit phenolhaltiger Lösung aus linksventrikulärem Myokardgewebe eine homogene Suspension herzustellen um daraus die RNA herauszulösen. Die so gewonnenen Nukleinsäuren werden dann mit Waschschritten und einem DNase Verdau aufgereinigt. Die

Quantifizierung erfolgt mit einem Photometer. Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit zur Quantifizierung der ANP-, BNP- und GAPDH- mRNA Expression mit Hilfe einer Real-time PCR-Maschine (Applied Biosystems) genutzt. Die Durchführung der RNA-Isolation erfolgte nach dem Protokoll der Firma Peqlab, von dem das von uns verwendete Kit (PeqGold Trifast, Cat. 30-2020) stammt.

Man zerkleinert mit einem Mörser etwa 70 mg Gewebe des linken Ventrikels unter Kühlung mit Flüssigstickstoff. Das Gewebepulver wird mit 1 ml phenolhaltigem peqGoldTrifast versetzt, mit dem Vortexer durchmischt und für 5 min unter einem Abzug bei RT inkubiert. Bei diesem Schritt werden die Zellen lysiert. Danach pipettiert man 200 µl Chloroform hinzu um eine Emulsion herzustellen und vortext mindestens 25 sec. Dieser Ansatz bleibt 8 min unter dem Abzug bei RT stehen und wird anschließend 5 min bei 4°C in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Nun ergeben sich aufgrund unterschiedlicher Dichtegradien 3 Phasen, eine obere wässrige, eine schmale mittlere Intermediärphase (enthält die Proteine) und eine untere organische Phase, wobei die obere wässrige Phase die RNA enthält. Beim Abnehmen der oberen wässrigen Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß muss man vorsichtig vorgehen, um keine Phasenvermischung zu erhalten. Für die RNA-Präzipitation werden dem Überstand 500 µl 100 % Isopropanol (Merck) zugegeben und die Probe bei -80°C über Nacht gefällt. Am nächsten Tag zentrifugiert man 10 min mit 13000 rpm bei 4°C. Das so erhaltene kleine Pellet mit angereicherter RNA wird 2-mal mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen, um störende Salze zu entfernen. Dann wird das Pellet etwa 5 min bei RT getrocknet. Zum Lösen des RNA-Pellets wird dieses mit 50 µl 0,1% DEPC-H₂O versetzt. Der Zusatz von Diethylpyrocarbonat (DEPC) zum Wasser inhibiert RNAsen. Da chromosomale DNA-Kontaminationen in dem RNA-Isolat die Reverse Transkription behindern und somit in der anschließenden PCR zu falschen Ergebnissen führen können, wird ein DNase Verdau durchgeführt.

Substanz	Menge in μl
10 x DNase-I- Puffer	2,0
DNase I (Peglab, Cat. 04-1180)	2,0
RNAse Inhibitor (40 U/ μl von Promega, Cat.N2611)	0,5
Volumen Total	10,0
Nukleasefreies H ₂ O	5,5
RNA (10 μg)	nach Berechnung

Der Ansatz inkubiert in einem Thermocycler (VWR):

Bezeichnung	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Zeit
Step 1	37	30 min
Step 2	75	5 min
Storage	4	unendlich

Als nächster Schritt folgt die RNA-Messung. Diese wurde an einem Photometer, dem NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Peglab) durchgeführt. Dabei pipettiert man 1 μl unverdünnte Probe in das Photometer. RNA absorbiert aufgrund seiner Struktur im UV-Bereich, das Absorptionsmaximum liegt bei 260 nm. Nach der Messung kann die Nukleinsäure für eine Reverse Transkription eingesetzt werden. Gelagert wird die RNA bei -80°C .

3.6 Reverse Transkription

Die im vorherigen Versuch isolierte RNA kann nun revers transkribiert werden, das bedeutet RNA wird in mehreren Schritten in DNA umgeschrieben. Dazu bedient man sich dem Enzym Reverse Transkriptase, das unter anderem die Funktion besitzt, einzelsträngige RNA in komplementäre doppelsträngige DNA (cDNA = copy DNA) umzuschreiben. Mit dieser können dann anschließend molekularbiologische Versuche wie die Real-Time PCR durchgeführt werden. Bei der Reversen Transkription wurde das Kit und das Protokoll der Firma Applied Biosystems verwendet (High capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Cat. 4368814).

Zur Herstellung eines 20 µl Ansatzes pipettiert man die Substanzen aus dem Kit mit 2 µg RNA in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß folgendermaßen zusammen:

Substanz	Menge in µl
10x RT Puffer	2,0
10x RT Random Primer	2,0
25 x dNTP Mix (100 mM)	0,8
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	1,0
RNAse Inhibitor	1,0
Volumen Total	20,0

Dieser Mix wird in einem Thermocycler (VWR) mit folgendem Programm inkubiert:

Bezeichnung	Temperatur in °C	Zeit
Step 1	25	10 min
Step 2	37	120 min
Step 3	85	5 min
Storage	4	unendlich

Die cDNA wurde in unseren Versuchen für Real-Time PCRs eingesetzt. Aufbewahrt wurde sie bei -20°C.

3.7 Real-Time Polymerase Chain Reaktion

Die Real-Time PCR funktioniert im Prinzip wie eine normale PCR, d.h. der Ansatz besteht aus einem cDNA-Template aus z.B. einer Reversen Transkription, einem forward und einem reverse Primer, dem PCR-Puffer mit Nukleotiden und einer thermostabilen DNA-Polymerase. Im Unterschied zur normalen PCR befinden sich in dem Mix fluoreszierende Farbstoffe (Sybr Green), die bei der Amplifikation an die neu gebildete doppelsträngige DNA binden und Leuchtsignale abgeben. Anhand der Intensität dieser Leuchtsignale kann mit Hilfe entsprechender Hard- und Software in

Echtzeit die Menge an gebildetem PCR-Produkt und somit die Geschwindigkeit der PCR gemessen werden, ohne dass für die Genexpressionsanalyse eine Gelelektrophorese erfolgen muss. Am Bildschirm wird die PCR-Kurve dargestellt, sobald die gebildete DNA-Menge ein Mindestmaß (die so genannte baseline) überschreitet. Je mehr PCR-Produkt da ist, desto schneller läuft die Reaktion. Am Bildschirm sieht man eine Exponentialkurve und der Cycle Threshold (=Ct-Wert) bzw. Schwellenwert ist der Zyklus, bei dem die PCR am schnellsten läuft bzw. die Reaktion ihr Optimum hat. Dieser Ct-Wert korreliert mit der im Ansatz vorhandenen cDNA-Menge. Im späteren Verlauf der PCR läuft die Reaktion wieder langsamer, weil sich das Gleichgewicht zugunsten einer Übersättigung mit PCR-Produkt und einem Mangel an dNTPs verschiebt.

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Form der Real-Time PCR kamen ebenfalls sogenannte Taqman-Sonden zum Einsatz, die hochspezifisch an die zu untersuchende Zielsequenz binden. Hierbei wird im Gegensatz zu der eher unspezifischen Fluoreszenz des SYBR Greens bei der normalen Real-Time PCR genau ein Lichtsignal pro Kopiervorgang der Taqman-Sonde, dem sog. Quencher, ausgesendet. Dies führt zu einer sehr großen Sensitivität der Messung, das bedeutet auch sehr niedrige Expressionslevel eines Gens können zuverlässig gemessen werden. Das Prinzip des Taqmans basiert auf dem fluorescence resonance energy transfer (FRET). Dabei setzt sich eine Sonde aus einem Oligonukleotid, gekoppelt mit einem Fluorochrom und Quencher, welche sich in unmittelbarer Nachbarschaft befinden, zusammen. Das Oligonukleotid bindet spezifisch an die target-cDNA und erhöht damit die Sensitivität der Amplifikation. Das Fluorochrom (= erstes Molekül von 3' → 5'-Ende auf dem Oligonukleotid betrachtet) ist der Donator, gibt also Licht einer bestimmten Wellenlänge E1 an den benachbarten Quencher ab, welcher das Licht verschluckt. Der Quencher hat die Funktion, die vom Donator gesendete Energie E1 so zu minimieren, dass keine Fluoreszenz gemessen werden kann, bis das Oligonukleotid von der Polymerase abgebaut wird und nach Trennung des Fluorochroms vom Quencher die frei gewordene Energie E1 als Lichtsignal messbar wird. Das gemessene Fluoreszenzsignal ist direkt proportional zu der DNA-Menge in der Probe und wird nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode quantifiziert.

Bei dieser relativen Quantifizierung trägt man die Emission gegen die Zyklenzahl auf und bezieht die Expression des gesuchten Gens auf die Expression des Housekeeping-Gene, hier der GAPDH, da die Expression dieses Gens unter verschiedenen Versuchsbedingungen nicht beeinflusst wird. Die Berechnung nach der $\Delta\Delta Ct$ - Methode setzt eine gleiche Effizienz der abgelaufenen PCR- Reaktionen voraus. Beträgt diese 100% so verdoppelt sich die DNA Menge in jedem Reaktionszyklus. Die Effizienz kann mit der Formel $E = 10^{(-1/m)}$ berechnet werden. ΔCt gibt den Expressionsunterschied bezogen auf GAPDH an:

$$\Delta Ct = Ct (\text{Gen}) - Ct (\text{Housekeeping Gen})$$

$\Delta\Delta Ct$ gibt die Expressionsdifferenz zwischen zwei Gruppen an:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{Gruppe1}) - \Delta Ct \text{ Kontrolle}$$

Das $\Delta\Delta Ct$ kann zur Berechnung der Ratio zwischen diesen Gruppen herangezogen werden, indem man es als negativen Exponenten zur Zahl 2 setzt: $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

Zum Einsatz kam ein PCR-Gerät Step One Plus der Firma Applied Biosystems. Die Substanzen für den Taqman sind von der Fa. Applied Biosystems (Cat.4369016).

Taqman Mastermix-Ansatz:

Substanz	Menge in μl
2x TaqMan Gene Expression Master Mix	5,0
20x TaqMan Gene Expression Assay (Sonde)	0,5
RNase-freies Wasser	14,5
Volumen Total	20,0
Template	1,0

TaqMan Sonden (Applied Biosystems)

Gene	Sondennummer
ANP (maus)	Mm01255747_g1
BNP (maus)	Mm01255770_g1
GAPDH (maus)	Mm99999915_g1

Forward and Reverse Primer für Real-Time PCR (human)

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
ANP	GAT AAC AGC CAG GGA GGA CA	ATC ACA ACT CCA TGG GAA CA
BNP	TTC TTG CAT CTG GCT TTC CT	AGG GAT GTC TGC TCC ACC
REST	GAA TCT GGC TCT TCC ACT GC	GTG TGG TGT TTC AGG TGT GC
αMHC	GAA AAA GGG CTC ATC CTT CC	GAT GAT GCA ACG CAC AAA GT
Serca2A	ACC CAC ATT CGA GTT GGA AG	CAG TGG GTT GTC ATG AGT GG
GAPDH	ATG ACA TCA AGA AGG TGG TG	CAT ACC AGG AAA TGA GCT TG
Synapsin 1	AAT ACT GGC TCT GCG ATG CT	TGT CTT CAT CCT GGT GGT CA

3.8 Western Blot

Der Western Blot ist eine molekularbiologische Methode zum Nachweis der Proteinexpression in Zellen und Geweben. Die Methode setzt sich aus Proteinisolation, Proteinbestimmung, Gelelektrophorese (SDS-PAGE), Transferblot und Detektion zusammen.

Proteingewinnung

Die Gewebe wurden zwei verschiedenen Protokollen zur Proteingewinnung unterzogen. Im ersten Protokoll wurde eine Gesamtlyse der Gewebeproteine durchgeführt. Zunächst sollte überprüft werden, ob in Herzgewebe unter 1 mM Wasserstoffperoxidperfusion der Redoxstatus zugunsten der Oxidation verschoben ist. Dazu wurde ein Antikörper gegen das Protein Peroxiredoxin-SO₃ (Gentaur, LF-PA-0004) benutzt, das bei hohem Oxidationslevel den Redoxstatus in den Zellen widerspiegelt.

Gesamtlyse

Linksventrikuläres Myokard werden in 600 µl Gesamtlysepuffer durch Potttern homogenisiert und für 10 min bei 13000 rpm in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet bestehend aus Zellbestandteilen wird verworfen und der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bei -80°C aufbewahrt.

Gesamtlysepuffer (50 ml): 5ml 1 M Tris pH 6,8
10 ml 20% SDS
10 ml Glycerol
25 ml Wasser

Cytosolisch-nukleäre Fraktionierung

Um der Frage nachzugehen, in welchem Zellkompartiment (Cytosol oder Nukleus) sich HDAC4 nach der Induktion von oxidativem Stress befindet, wurde eine cytosolisch-nukleäre Fraktionierung durchgeführt. Dazu wurde Myokardgewebe in 600 µl Puffer A homogenisiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden 25 µl 10 % Igepal (Sigma) hinzupipettiert, welches die Zellmembran permeabilisiert und somit die Lyse unterstützt. Die Probe wird gut gevortext und 30 s bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der so erhaltene Überstand entspricht der cytosolischen Fraktion und wird in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dem Pellet werden 200 µl Puffer C zugegeben und vermischt, bis eine Suspension entsteht. Erneut erfolgt eine 15 minütige Inkubation auf Eis und im Anschluss eine Zentrifugation für 5 min bei 14000 rpm in einer Kühlzentrifuge bei 4°C. Der Überstand enthält die nukleäre Fraktion und

wird in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert. Das Pellet wird nun verworfen. Nach der Proteinisolation mittels Gesamtlyse oder cytosolisch-nukleärer Fraktionierung erfolgt die Proteinmessung.

Puffer

Puffer A

500 µl 1M HEPES pH 7,9

500 µl 1M KCl

10 µl 0,5 M EDTA

50 µl 0,1 M EGTA

500 µl 0,1 M DTT

500 µl 0,1 M PMSF

1 Tablette Complete mini Proteaseinhibitor

Ad 50 ml Aqua dest.

Puffer C

1 ml 1M HEPES pH 7,9

4 ml 5 M NaCl

100 µl 0,5 M EDTA

500 µl 0,1 M EGTA

500 µl 0,1 M DTT

500 µl 0,1 M PMSF

1 Tablette Complete mini Proteaseinhibitor

Ad 50 ml Aqua dest.

Proteinbestimmung nach Lowry

Wir benutzen dazu die Reagenzien von der Firma Biorad, welche aus den Reagenzien A (Cat. 500-0113) und B (Cat. 500-0114) bestehen.

Das Messprinzip beruht auf zwei Reaktionsschritten, was die Methode sehr sensitiv macht.

1. Die Biuretreaktion: Cu (II)- Ionen, die sich in alkalischer Lösung spezifisch an Peptidbindungen anlagern, bilden einen quadratisch-planaren Komplex, der zu einem blau-violetten Farbumschlag führt.
2. Der Kupfer-Protein Komplex bewirkt eine Reduktion von dem im Folin-Ciocalteu's-Phenol-Reagenz (Folin-Reagenz) enthaltendem Molybdat bzw. Wolframat, was zu einem blauen Farbumschlag führt. Die daraus resultierende Blaufärbung korreliert mit der Proteinkonzentration in der Probe und kann in einem Photometer (Beckmann und Coulter) quantifiziert werden.

Protokoll:

2 µl Probe werden mit 18 µl A. dest in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß verdünnt, der Leerwert besteht aus 2µl Puffer und 18 µl A. dest. Nun werden nacheinander 100 µl Reagenz A und 800µl Reagenz B hinzupipettiert, anschließend gut geschüttelt und mindestens 15 min bei RT inkubiert. Der so entstandene Farbkomplex bleibt für 60 min stabil. Die Messung erfolgte als Doppelbestimmung bei 500 nm. 50 µg Protein wurden entnommen und in einem Verhältnis von 1:1 mit 1x Ladepuffer versetzt. Im Ladepuffer befindet sich SDS (Sigma), was eine negative Ladung aller Proteine bewirkt. Damit haben die Moleküle bei der folgenden elektrophoretischen Auftrennung eine gleichgesinnte Laufrichtung entlang des elektrischen Gradienten. Eine Denaturierung erfolgt zum einem chemisch durch beta-Mercaptoethanol (Sigma) im Ladepuffer, welches die Disulfidbindungen im Protein reduziert und zum anderen thermisch durch ein 5 minütiges Aufkochen der Probe bei 95°C. Aus der Summe der chemischen und thermischen Denaturierung werden die Sekundärstrukturen der Proteine aufgelöst und die Antigene für die Antikörper zugänglich. Im Anschluss erfolgt die Gelelektrophorese.

Puffer

<u>Ladepuffer für Western Blot Stock-Lösung</u>	<u>1 ml-Gebrauchslösung</u>
2,5 ml Tris HCl pH 6,8	850 µl Stock-Lösung
2 ml 100% Glycerol	100 µl beta-Mercaptoethanol
2 ml 10% SDS	50 µl DTT (Dithiothreitol)
0,002% Bromphenolblau	
Ad 10ml Aqua dest	

3.9 Pulldown-Assay

Präzipitation

Linkes Myokardgewebe wird mit 350 µl RIPA Puffer durch Pottern homogenisiert und mit 200 µM biotinyliertem Iodacetamid versetzt. Das biotinylierte Iodacetamid bindet irreversibel an freie Cysteinreste, diese vermuten wir an dem Protein HDAC4, welches wir unter oxidierten Zustand untersuchen möchten. Dieses Gemisch wird 10 min. auf Eis inkubiert und dann 10 min. bei 10.000 g zentrifugiert. Nachdem der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert wurde, erfolgt eine Proteinmessung nach Lowry. Für die Immunpräzipitation werden dann 1 mg Protein mit einem Zielvolumen von 300 µl eingesetzt, mit 20 µl Avidin-Beads (Thermoscientific IL, USA, Cat. 20219) versetzt und 2 h im Kühlraum auf einem Rotator inkubiert. Avidin bindet spezifisch an Biotin und bildet ein Cystein-Biotin-Präzipitat aus. Die Aufreinigung des Präzipitats erfolgt in 3 Waschschritten mit jeweils 1 ml RIPA Puffer. Dem Pellet, in dem sich das Präzipitat befindet, wird 20 µl Ladepuffer hinzupipettiert und in einem Heizblock kurz aufgeköcht. Schließlich kann die Probe in einem Western Blot Versuch analysiert werden.

Puffer

RIPA Puffer

50 mM Tris pH 7,5

150 mM NaCl

1% SDS

0,5% Desoxycholsäure

5 mM Edta

10 mM Na₄P₂O₇ (Natriumpyrophosphat)

1 mM Na₃VO₄ (Natriumorthovanadat)

1 mM NaF

0,05 mM AEBSF (4-(2-aminoethyl)benzensulfonylfluoridhydrochlorid)

1 Tablette Complete mini Proteaseinhibitor (Roche, Cat. 1187358000120)

Ad 50 ml Aqua dest.

Biotinyliertes Iodacetamid (bIAM, biotin ethylendiamin iodacetamid von Biotium CA, USA, Cat. 90059)

0,2 mM Gebrauchslösung in DMF (N,N-Dimethylformamid) ansetzen

Ladepuffer Stock-Lösung

666 µl 1,5 M Tris pH 6,8

2 ml 10% SDS

500 µl Glycerol

0,05% Bromphenolblau

Ad 10 ml Aqua dest.

1 ml Gebrauchslösung: 20 µl beta-Mercaptoethanol hinzugeben.

3.10 SDS-PAGE (Sodium dodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese)

Hinter dieser Methode verbirgt sich der Standard der Proteinauftrennung. Das Prinzip besteht darin, die gleichsinnig geladenen Proteine nach ihrer molekularen Masse in einem SDS-Polyacrylamidgel aufzutrennen. Dieses setzt sich aus einem Sammelgel und einem 8 % Trenngel zusammen.

Sammelgel:

Substanz	Menge in ml
Aqua Dest.	2,1
30% Bisacrylamid (Biorad, Cat. 161-0156)	0,5
1,5 M Tris-HCl pH 6,8	0,38
10% SDS	0,03
10% Ammoniumpersulfat	0,03
TEMED	0,003
Volumen Total	3,0

8% Trenngel:

Substanz	Menge in ml
Aqua Dest.	4,6
30% Bisacrylamid	2,7
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5
10% SDS	0,1
10% Ammoniumpersulfat	0,1
TEMED	0,006
Volumen Total	10,0

Um die Gele mit Proben befüllen zu können, wird ein Slotkamm (Biorad) in das noch flüssige Sammelgel gesteckt. Nach Erhärtung des Gels wird dieser gezogen und das Gel in eine Elektrodeneinheit eingespannt und senkrecht in eine Kammer mit 1x Elektrophoresepuffer gestellt. Es folgt die Beladung des Gels, wobei in die erste Tasche der Marker (Mischung aus gefärbten Standardproteinen mit bekannten Größen) (Biorad, Precision Plus Protein Dual Color Standards, Cat. 161-0374) und in die folgenden die Proben pipettiert werden. Anschließend wird die Kammer an eine Stromquelle angeschlossen. Die Elektrophorese läuft bei einer Spannung von 100 V etwa 2 h. Die Gebrauchsmaterialien für die Elektrophorese stammen von der Fa. Biorad (Mini-Protean Tetra Cell, Cat. 165-8000).

Puffer

Stammlösung 10x Gelelektrophoresepuffer:

50 g SDS

720 g Glycin

151,5 g Tris Base

5 l Aqua dest.

1x Gelelektrophoresepuffer:

Verdünnung der Stammlösung 1:10

3.11 Western-Transferblot

Bei einem Transferblot werden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dabei nutzt man wieder das Prinzip, dass Proteine entlang des elektrischen Gradienten wandern, wie schon beim Agarosegel beschrieben. In dieser Arbeit fand die Nassblot-Methode Verwendung und zum Einsatz kam ein Transblot-System, (Biorad, Mini Trans-Blot Cell, Cat. 170-3930) bestehend aus einem Powerpack, einer Kammer, einer Elektrodeneinheit mit Anode und Kathode, einem Kühlakku und einer Gelhalterkassette mit zwei Schwämmen besitzen. Als erstes bereitet man den Transferpuffer vor, den sogenannten Towbin-Puffer, indem man die Stammlösung 1:10 verdünnt und etwa 1l davon in die Kammer gießt. Dann stellt man die Elektrodeneinheit und den Kühlakku hinein, letzteres beugt eine Überhitzung während dem elektrischen Transfer vor. Es folgt der Aufbau der Gelhalterkassette, wozu 2 Schwämme, Chromatographiepapier (Whatman, Cat. 3030917), Nitrocellulose Transfer Membran (VWR, Cat. 732-4016) und das Gel mit den bereits aufgetrennten Proteinen benötigt werden. Die Materialien, mit Transferpuffer befeuchtet, werden in der Kassette wie ein Sandwich angeordnet. Begonnen wird mit einem Schwamm, 3 dünnen Filterpapieren und dem Gel. Darauf wird vorsichtig und luftblasenfrei die Nitrocellulosemembran gelegt, abschließend wieder 3 Filterpapiere und ein Schwamm. Die im Anschluss verschlossene Kassette wird senkrecht in die Elektrodeneinheit gesteckt, in die Kammer gestellt und an eine Stromquelle (Powerpack) unter einer Stromstärke von 300 mA angeschlossen. Nach 90 min ist der Proteintransfer beendet und der Blot wird abgebaut. Die Membran wird mit Aqua dest. gespült, um das in dem Puffer enthaltene Methanol zu entfernen. Anschließend überprüft man, ob die Proteine gut aufgetrennt sind und auf die Membran übertragen wurden. Dazu gibt man den proteinaffinen Farbstoff Ponceau S (Sigma, cat. 78376) auf die Membran und die Proteinbanden färben sich rot an. Zum Entfärben spült man die Membran mit 1x TBS-Puffer und legt sie für 1h in 5 % Milch (1,5% Magermilchpulver in 1x TBS-Puffer) zum Blocken. Die Proteine in gelöstem Magermilchpulver blockieren freie unspezifische Proteinbindungsstellen und ermöglichen somit eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion. Nach dem Blocken wird die Membran mit einem Primärantikörper inkubiert.

Wir benutzten dazu folgende Antikörper: HDAC4 (Anti Histone Deacetylase 4 von Sigma, Cat. H9411), GAPDH (Millipore, Cat. MAB374) und RNA-Polymerase II

(Millipore, Cat. 05623). Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht mit einer Antikörper-Verdünnung von 1:1000 mit 5 % Milch in TBS-Puffer.

Puffer

Stammlösung 10x Transferpuffer (Towbin Puffer): 250 mM Tris-Base
1,92 M Glycin

1x Gebrauchslösung (1x Towbin):

1:10 Verdünnung der Stammlösung + 80 ml Methanol

10x TBS pH 7,5: 500 mM Tris Base
1,5 M NaCl

1x TBS: 1:10 Verdünnung von 10x TBS

1x TBS-T: 1:10 Verdünnung von 10x TBS
0,1% Tween 20

Detektion

Der Proteinnachweis erfolgt nach dem Prinzip der Antigen-Antikörperreaktion. Dazu bedient man sich eines Primär- und Sekundärantikörpers. Der Primärantikörper bindet spezifisch an ein Epitop auf dem untersuchten Protein, wohingegen der Sekundärantikörper gegen ein speziestypisches Antigen auf dem Primärantikörper gerichtet ist. Hier wurden aus der Ziege (engl.: Goat) stammende Primärantikörper verwendet. Wir benutzten die Sekundärantikörper Goat-anti-Rabbit IgG (Biorad, cat. 172-1090) und Goat-anti-Mouse IgG (Sigma, Cat. A5278), die beide mit der Meerrettich-Peroxidase gekoppelt sind.

Das Protokoll:

Die über Nacht mit Primärantikörper inkubierte Membran wird 2x 10 min in 1x TBS gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Daraufhin wird der Sekundärantikörper 1:10000 verdünnt, in 1% Milch-TBS-Suspension, zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, wonach erneut für 2x 15 min in 1x TBS-T und 2x 10 min in 1x TBS gewaschen wird. Abschließend erfolgt die auf Chemilumineszenz beruhende Detektion mit ECL (GE-Healthcare, Cat. RPN 2106). Das Kit besteht aus 2 Reaktionslösungen, welche das Substrat für das am Sekundärantikörper gebundene Enzym enthalten und einen schwarzen Farbumschlag bewirken. Dazu pipettiert man auf die mit Aqua dest. gereinigte Membran nacheinander Reaktionslösung 1 und 2 und legt im Dunkelraum die Membran mit einem Film (GE-Healthcare, Cat. 28906837) in eine Entwicklerkassette zur Inkubation. Nach gewünschter Zeit legt man den Film in eine Entwicklermaschine (AGFA), die mit Entwicklerlösung, Fixierlösung und Wasser befüllt ist, wonach, abhängig von der Proteinmenge und Exposition, schwarzgefärbte Banden auf dem Film zu sehen sind. Die Banden wurden mit einem Computerprogramm „Labworks“ mittels Densitometrie, vergleichbar zur PCR, quantifiziert. Die Verrechnung erfolgte gegen das Housekeeping-Protein GAPDH.

3.12 Langendorffanlage



Die Versuchsdurchführung erfolgte durch unsere MTA Frau Michelle Gulentz. Den euthanisierten C57/BL 6 N-Mäusen wurden die Herzen entnommen und in die Langendorffanlage gehangen. Darin werden die Herzen entweder mit 1 mM Wasserstoffperoxid (30% ig von Merck, Cat. 1.07209.1000) oder mit 1 N Tyrode (als Kontrolle) perfundiert und im Anschluss für weitere Versuche unter flüssigen Stickstoff weggefroren.

Die Herzen wurden je nach Versuchszwecken, entweder 10 min., zum Nachweis von oxidiertem HDAC4 mittels Pulldown-Assay oder 30 min., zum Nachweis der HDAC4-Lokalisation mittels Western Blot-Analysen, perfundiert.

Puffer

1 N Tyrode 1l (Ca²⁺-frei)

CaCl₂ 0,01 g

NaCl 7,6 g

KCl 0,34 g

MgCl₂ 0,2 g

Na-Hepes 2,6 g

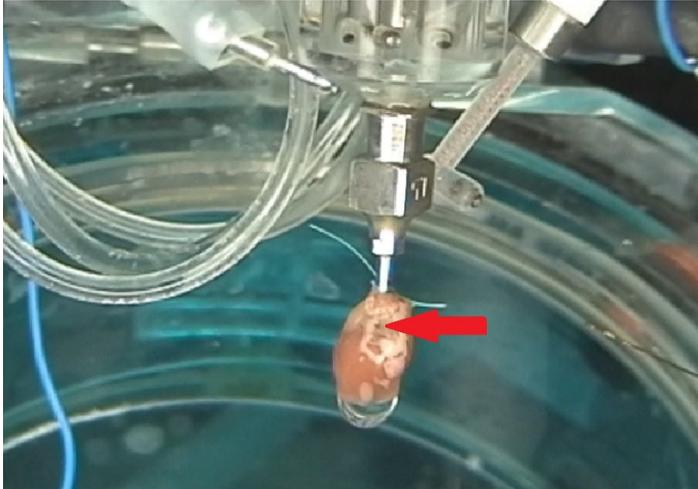
Na-Pyruvat 0,2 g

Ascorbinsäure 0,053 g

Glucose 1,8 g

pH 7,54

3.13 Working Heart



Die Versuche erfolgten mit Unterstützung durch MTA Frau Jeannette Zimolong.

Den euthanisierten C57/BL6 N-Mäusen wurden die Herzen entnommen und in die Anlage gehangen. Die Perfusion erfolgt in 1 N Tyrode unter zunächst physiologischer Vor- und Nachlast (10 mmHg bzw. 80 mmHg). Zur Erhöhung der kardialen Nachlast wurde diese für 15 min auf 120 mmHg erhöht, ohne dass hierbei die Vorlast (10 mmHg) oder die Stimulationsfrequenz erhöht wurde (400 bpm). Anschließend wurden die Herzen für weitere Versuchszwecke wie Western Blots und mRNA-Expressionsmessung weggefroren.

Puffer

1 N Krebs-Hendeleit-Lösung für Working Heart 1l

CaCl₂ 0,37 g

NaCl 6,78 g

KCl 0,34 g

NaHCO₃ 2,09 g

NaH₂PO₄ 0,16 g

Glucose 1 g

MgSO₄ 0,4 g

3.14 Geräte

Tischzentrifuge (VWR)

Kühlzentrifuge (Eppendorf)

Überkopf-Rotator (VWR)

Ultraschall Sonifier (Branson)

Heizblock (Eppendorf)

Thermocycler (VWR)

Gelkammersystem für Agarosegel-Elektrophorese (Biorad)

Photometer für RNA-Messung (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Peqlab)

Real-Time PCR-Gerät (Step One Plus, Applied Biosystems)

Photometer für Proteinmessung (Beckmann und Coulter)

Zubehör für Gelelektrophorese und Western Blot stammen von der Fa. Biorad (Mini-Protean Tetra Cell und Mini Trans-Blot Cell)

Entwicklermaschine (Agfa)

Anmerkung zu den Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von den Firmen Sigma, VWR oder Merck bezogen, außer es wurde gesondert im Methodenteil vermerkt.

4. Ergebnisse

4.1 Genexpressionsprofil bei terminaler Herzinsuffizienz

Der Herzinsuffizienz liegt eine neuroendokrine Aktivierung zu Grunde, die ein kardiales Remodeling begünstigt. Es ist bekannt, dass diese Umbauprozesse im Herzmuskel mit einer Reaktivierung der natriuretischen Peptide ANP und BNP sowie einer veränderten Genrepression der Sarcoplasmatischen Reticulum ATPase 2a (Serca2A) und des Myosin-Heavy Chain alpha (α -MHC) einher geht. Um die Reaktivierung der fetalen Gene ANP und BNP in den hier verwendeten insuffizienten Herzen sicherzustellen wurde zunächst mit Hilfe von Real-Time PCR-Analysen ein Expressionsprofil erstellt. Dazu verglichen wir die mRNA-Expressionslevel von ANP, BNP, α -MHC und SERCA2a in gesunden nichtverwendeten Spenderherzen (NF) mit insuffizientem (F) humanen Myokard von Patienten mit einer ischämischen (ICM) bzw. einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM). Da es keine signifikanten Unterschiede zwischen ICM und DCM gab, wurde diese Gruppe im folgenden als „Failing“ (F) bezeichnet (Abb. 8). In den insuffizienten Herzen detektierten wir eine signifikante Erhöhung der ANP- und BNP Genexpression (Abb. 8A, 8B) und zugleich einen erniedrigten α -MHC und SERCA2a-mRNA Expressions-Level (Abb. 8D, 8E). Zudem konnten wir zwischen ANP und BNP eine positive Korrelation (Abb. 8C) und zwischen SERCA2a und BNP eine negative Korrelation feststellen (Abb. 8F).

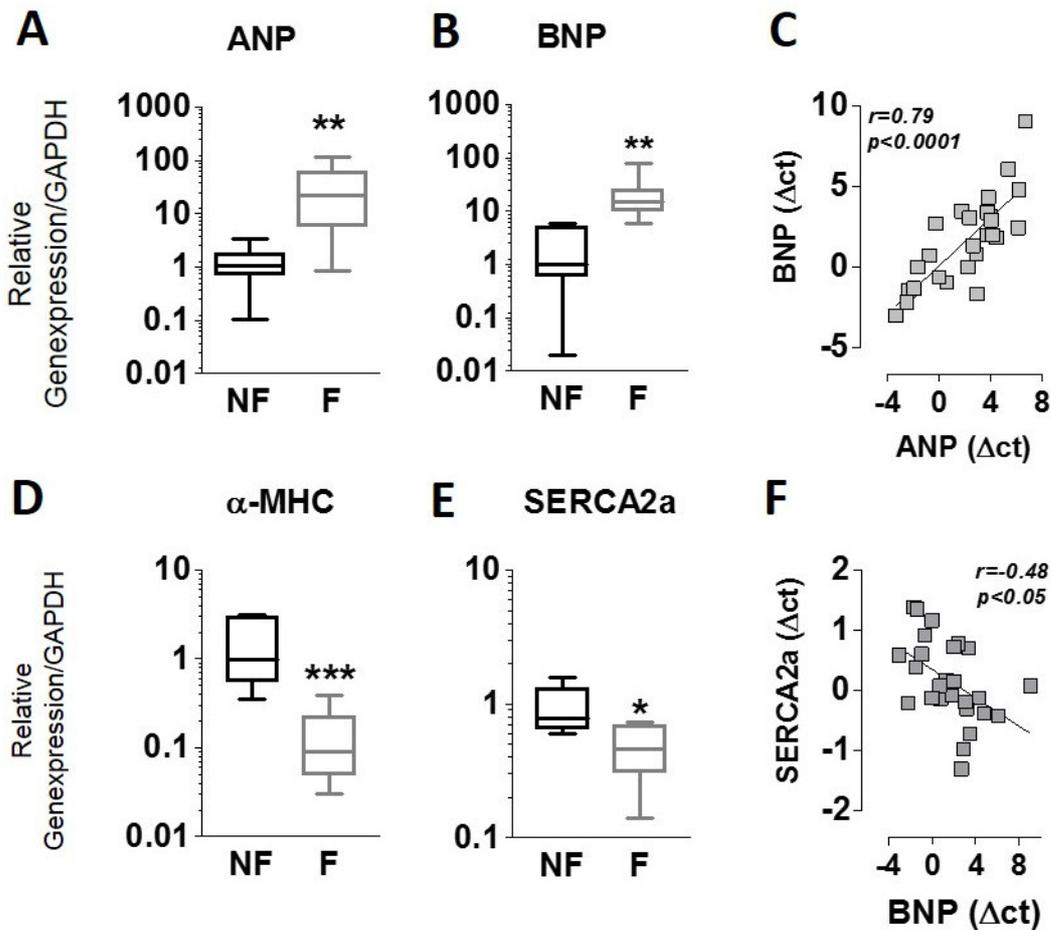


Abb. 8: mRNA-Expressionslevel in gesundem (NF) und insuffizienten (F) humanem Myokard

Die Expressionslevel wurden mittels Real-Time PCR bestimmt und gegen GAPDH verrechnet. Die Daten der kranken Herzen (F; n=16) setzen sich aus Proben der ICM und DCM zusammen. Expression von ANP (A) und BNP (B) im Vergleich zu den gesunden Herzen (NF; n=8). Positive Korrelation zwischen den mRNA-Leveln von ANP und BNP (C). Genexpressionslevel von α -MHC (D) und Serca2a (E). (F) zeigt eine negative Korrelation zwischen den mRNA-Leveln von Serca2a und BNP.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ und **** $p<0.001$

4.2 Die Rolle des RE1 Silencing Transkription Faktor (REST) bei der Reaktivierung der fetalen Gene ANP und BNP

Kuwahara et al. (2003) zeigten in einem Mausmodell, dass die Expression bestimmter fetaler Gene durch das Repressorprotein REST negativ reguliert wird. Dabei wurde gezeigt, dass es im Zuge einer TAC-induzierten Hypertrophie zu einer Herunterregulation des Repressors REST kam, was wiederum in einer erhöhten BNP Expression resultierte. Demnach scheint eine Reaktivierung fetaler Gene die Herabregulation ihres Repressors REST vorauszusetzen. Um herauszufinden, welche Rolle REST bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz beim Menschen spielt, wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst der Expressionslevel des Repressors mittels Real-Time PCR und Western Blot Experimente analysiert. Dazu wurde die REST-Expression in gesundem und insuffizientem humanen Myokard untersucht. Als Positivkontrolle für eine starke REST-Genexpression diente hier die embryonale Nierenzelllinie 293T. Als Negativkontrolle für eine geringe REST-Genexpression wurde die Neuroblastomazelllinie (SYSH5Y) verwendet.

Unsere Daten zeigen, dass es in insuffizienten Herzen gegenüber den gesunden Herzen zu keiner signifikanten Veränderung der REST-Genexpression kam. Wie erwartet konnten wir in der Nierenzelllinie 293T eine hohe REST-Expression nachweisen, hingegen in der Neuroblastomazelllinie SHSY-5Y eine nur geringe Expression detektieren (Abb. 9A). Zusätzlich zur mRNA Expression von REST sollte überprüft werden, ob der Repressor eventuell auf Proteinebene reguliert wird. Dazu wurden Western Blot Analysen aus Gewebe von gesunden Herzen mit den insuffizienten Herzgeweben verglichen. Abb. 9B zeigt, dass es keinen Unterschied in der REST-Proteinkonzentration gibt. Ein bekanntes, durch REST reprimiertes Zielgen ist das synaptische Vesikelprotein Synapsin I, dessen Expression auf Nervenzellen beschränkt ist. Dementsprechend konnten wir in den Neuroblastomzellen SHSY5Y eine starke Synapsin I-Expression feststellen (Abb. 9C). In dem von uns analysierten Herzgewebe hingegen wird Synapsin I nur sehr gering exprimiert. Somit liegt hier ein inverses Verhältnis zwischen der Expression des Repressorprotein REST und seines Zielgens Synapsin I vor.

Um eine Repression der Gene im Zellkern durchführen zu können ist die Lokalisation des Repressors von entscheidender Bedeutung. Um feststellen zu können, ob REST im Nukleus vorliegt bedienen wir uns der cytosolisch-nukleären Fraktionierung (Kap.3.8) mit anschließender Western Blot Analyse der beiden Fraktionen. Diese Experimente zeigten, dass REST ausschliesslich im Nukleus vorliegt, wobei es keinen Unterschied zwischen gesundem und insuffizienten Myokard gab.

Mit der nächsten Fragestellung prüften wir auf genomischer DNA-Ebene, ob REST an der NRSE-Sequenz in den regulatorischen Regionen seiner Zielgene ANP und BNP gebunden vorliegt und darüber die fetale Genexpression reguliert. Eine verminderte Bindung des Repressors an die Promotorregion seiner Zielgene könnte zu deren Aktivierung beitragen. Dazu führten wir sogenannte Chip-Assays (Kap. 3.2) durch. Für die nachfolgende semiquantitative PCR wählten wir die PCR-Oligonucleotide so, dass sie komplementär zur linken und rechten Seite der NRSE-Sequenz binden. Diese Methode ermöglicht uns einen Blick auf die Bindungsaktivität von REST an die NRSE-Bindesequenz in den regulatorischen Regionen von ANP und BNP. Unsere Daten zeigten, dass REST nicht vermindert an das NRSE der natriuretischen Peptide ANP und BNP in den insuffizienten Herzen gebunden vorliegt (Abb. 10A und B).

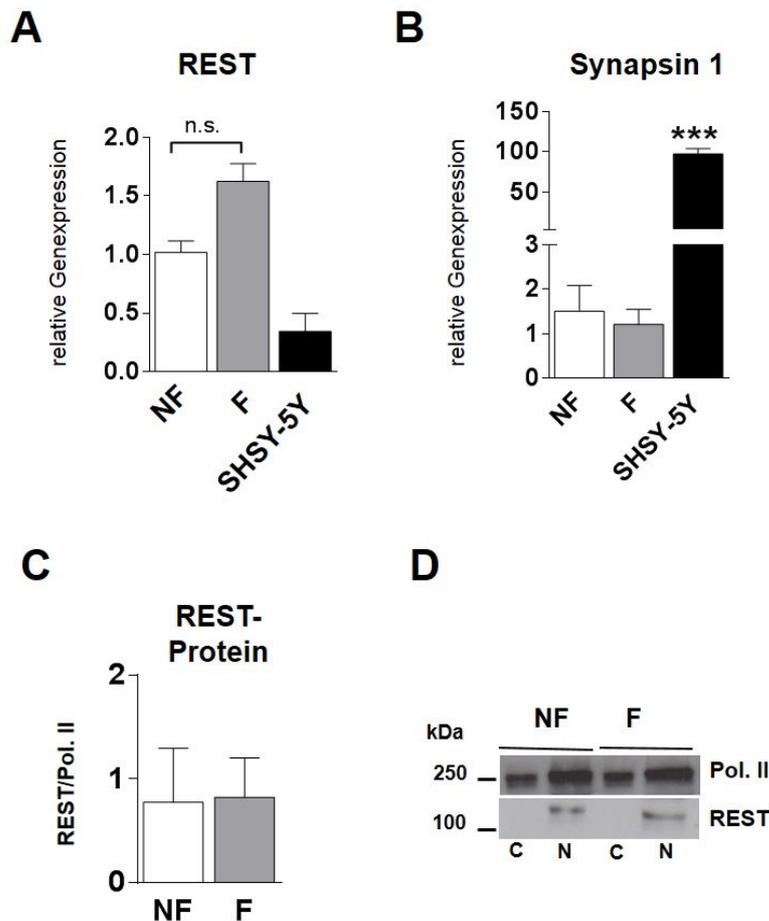


Abb. 9: Unveränderte Expression und Rekrutierung von REST in insuffizientem Myokard

Die Daten der insuffizienten Herzen (F) setzen sich aus Proben von Patienten mit ICM und DCM zusammen.

- A)** Real-time PCR-Analysen der REST-Genexpression in gesundem (NF, n=8) und insuffizientem (F, n=16) Myokard und in Neuroblastomzellen SHSY-5Y. Die Expressionslevel wurden gegen GAPDH verrechnet.
- B)** Real-time PCR-Analysen der Synapsin I-Genexpression in gesundem (NF, n=8) und insuffizientem (F, n=16) Myokard und in den Neuroblastomzellen SHSY-5Y (n=5). Die Expressionslevel wurden gegen GAPDH verrechnet.
- C)** Kumulative Western Blot-Analyse der REST Proteinexpression. Vergleich der Proteinlevel in gesundem und insuffizientem Myokard (n=6). REST wurde dabei gegen die Polymerase II verrechnet, einem nukleus-spezifischen Protein. Zur Proteingewinnung wurde die Methode der cytosolisch nukleären Fraktionierung angewandt.
- D)** Repräsentative Ergebnisse einer cytosolisch nukleären Westernblot-Analyse von REST und Polymerase II. in NF- und in F-Herzgewebe. n.s.= nicht signifikant, ***p<0.001; C=Cytosol, N= Nukleus

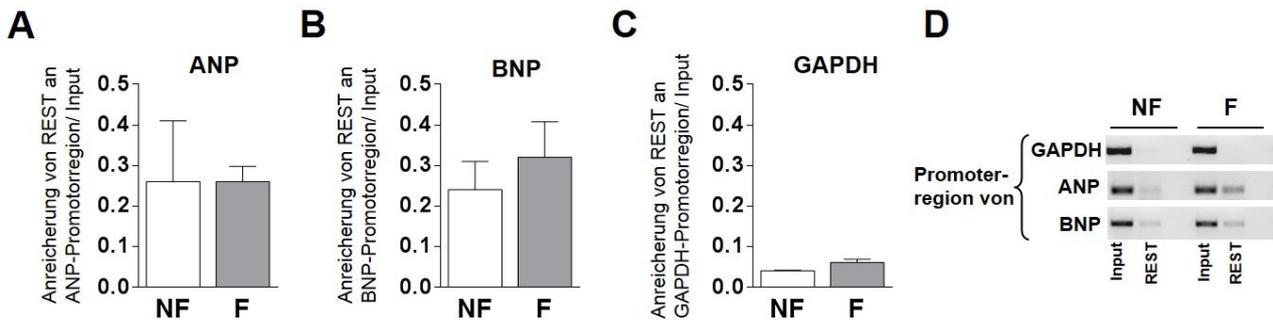


Abb. 10: ChIP Assay Experimente zur Messung der REST-Rekrutierung an die ANP, BNP und GAPDH Promoterregionen

Die Daten der insuffizienten Herzen (F) setzen sich aus Proben der ICM und DCM zusammen (n=2).

A-B) ChIP Assay Analysen zeigen, dass eine Rekrutierung von REST an das NRSE innerhalb des ANP- und BNP-Gens, in insuffizientem verglichen mit gesundem Myokard.

C) Promoterregion des Housekeeping Gens GAPDH in NF- und F-Herzen,

D) Repräsentatives PCR-Agarosegel eines ChIP Assay-Experimentes. Das Chromatin wurde mit einem REST-spezifischen Antikörper beladen, anschließend die Anreicherung an die NRSE-Bindesequenz seiner Zielgene ANP und BNP und als Negativkontrolle dem Housekeeping Gen GAPDH untersucht. Der Input stellt einen Baseline-Wert dar, mit dem die REST-Bindung verrechnet wird.

4.3 HDAC4 als Signal-responsiver Repressor fetaler Gene

Nakagawa et al. (2006) beschrieb, dass REST seine Repression der Genaktivität über die Rekrutierung von Histon-Deacetylasen ausübt. Als Teil dieses Repressorkomplex wurde die Ca/Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII)-responsive Histon Deacetylase 4 (HDAC4) beschrieben. HDAC4 ist ein bekannter Repressor prohypertropher Gene, die über den Transkriptionsfaktor MEF2 vermittelt wird. HDAC4 gehört zur Klasse der Signal-responsiven Histon Deacetylasen. Durch CaMKII-vermittelte Phosphorylierung wird HDAC4 aus dem Nukleus in das Cytosol transportiert und ist somit an der Repression seiner Zielgene nicht mehr beteiligt. Um eine potentielle Beteiligung von HDAC4 an der Reaktivierung der ANP und BNP-Genexpression im Zuge einer Herzinsuffizienz zu untersuchen sollten Mäuse entweder einer Transaortalen Einengung (transaortic constriction= TAC) oder einer Sham Operation (= Kontroll-OP, kein Eingriff erfolgt) unterzogen werden. 6 Wochen nach den OPs wurden die Tiere euthanisiert, das Herzgewicht zu Körpergewicht (HW/BW) bestimmt und anschliessend die Expressionslevel der beiden fetalen Gene und des Repressors REST im Herzgewebe mittels Real-Time PCR analysiert. Um die Lokalisation von HDAC4 zu untersuchen, wurden Western Blot Analysen durchgeführt

und dabei die cytosolische Proteinfraction mit der nukleären Proteinfraction auf die Anwesenheit von HDAC4 hin verglichen (Abbildung 11).

Abbildung 11A zeigt das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht (HW/BW), ein Maß für den Schweregrad der Hypertrophie zwischen Sham- und TAC- Mäuseherzen. Erwartungsgemäß nahm die Herzmasse in den TAC-Tieren zu, was für ein kardiales Remodeling spricht. In weiteren Versuchen haben wir Real-Time PCR Experimente durchgeführt um die mRNA-Expression von ANP, BNP und REST in den Herzgeweben zu überprüfen. In den TAC operierten Mäusen wurden signifikant erhöhte ANP (Abb. 11B) und BNP (Abb. 11C) Expressionen gegenüber den Kontrolltieren gemessen, wohingegen die REST-Expression unverändert bleibt (Abb. 11D). In unseren Western Blot Analysen beobachteten wir eine erhöhte Lokalisation von HDAC4 im Cytosol in den hypertrophierten TAC-Mausherzen. Um einen validen Gruppenvergleich zu erhalten, müssen die Expressionswerte des Zielproteins auf ein sogenanntes Housekeeping-Protein bezogen werden, von dem man weiß, dass es in allen Gruppen gleich exprimiert ist. Dies ist erforderlich um Beladungsunterschiede auf den Western Blot-Gelen zu berücksichtigen. Dazu wurde in meiner Arbeit für die Messung der cytosolischen Fraktion GAPDH verwendet und für die nukleäre Fraktion die mRNA-Polymerase IIa (Pol. II). Aus diesen Daten zogen wir den Schluss, dass der Export von HDAC4 eine essentielle Rolle bei der Reaktivierung der Gene ANP und BNP spielt, sodass der Focus in den folgenden Experimenten auf der Analyse von HDAC4 in verschiedenen Stressmodellen der Maus gerichtet wurden.

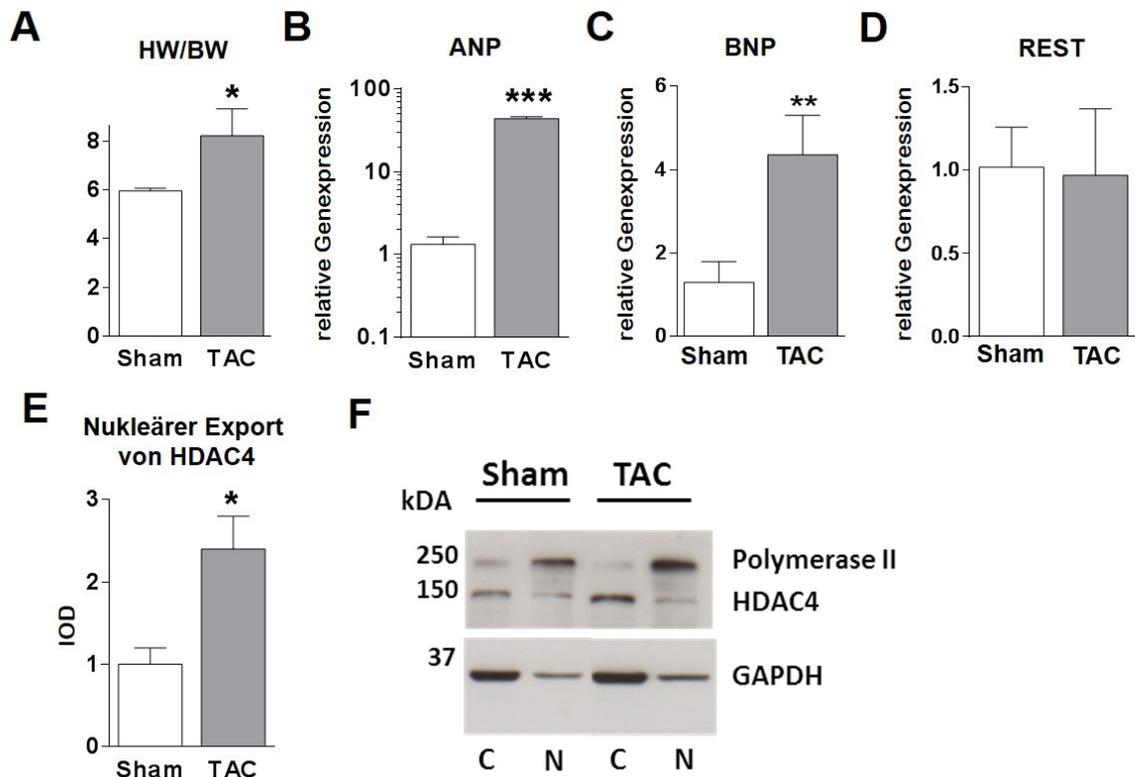


Abb. 11: Analysen murinen Myokards 6 Wochen nach TAC-OP vs. Sham-OP (n=4)

A)Verhältnis zwischen Herzgewicht (HW) zu Körpergewicht in TAC-operierten Mäusen und Sham-Tieren.

B-C) Die Real-Time PCR Analyse der fetalen Gene ANP und BNP in TAC-Tieren und Sham-operierten Tieren.

D) Real-Time PCR Analyse von REST.

E) Western Blot Analyse des HDAC4 Proteins nach cytosolisch-nukleärer Fraktionierung, um die Lokalisation von HDAC4 nachzuweisen.

F) Repräsentative Western Blot-Analyse einer cytosolisch-nukleären Fraktionierung zum Nachweis der Lokalisation von HDAC4, Polymerase II und GAPDH.

* $p < 0.05$ und *** $p < 0.001$; C=Cytosol, N= Nukleus

4.4 Oxidiertes HDAC4 in Stress-induzierten Mäuseherzen

Ago et al. (2008) zeigten, dass Phenylephrin-induzierter Zellstress in Kardiomyozyten mit einem erhöhten Vorkommen von oxidiertem HDAC4 einhergeht. Dies stellt eine Verbindung von adrenergem Stress, einem bekannten Pathomechanismus, über oxidativen Stress bis hin zur molekularen Regulation im Zellkern her. Wir wollten dieses Konzept überprüfen und haben einen ähnlichen experimentellen Ansatz mit dem Ziel, akuten Zellstress zu induzieren, gewählt. In seinen Versuchen konnte er mit Hilfe von massenspektrometrischer Analysen die Cysteingruppen 667 und 669 (Cys-667/Cys-669) als entscheidende Signalmoleküle für den cytonukleären Transport von HDAC4 aufdecken. In nicht gestressten Kardiomyozyten liegt der Repressor HDAC4 gebunden als Teil eines Multiproteinkomplexes an der DNA seiner Zielgene vor und Cys-667/Cys-669 sind reduziert. Durch ROS werden die Cysteinreste oxidiert, was eine Lösung von HDAC4 aus dem Multiproteinkomplex bewirkt, es folgt der nukleäre Export und somit die Reaktivierung des fetalen Genprogramms, ganz ohne Phosphorylierungseinfluss.

Hier sollte nun die Oxidation von HDAC4 und im Zusammenhang damit die resultierende Redoxregulation in Mäuseherzen nach Einwirkung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) untersucht werden. Bislang sind die Auswirkungen akuter Stressoren auf den nukleären HDAC4-Export und somit auf die Reaktivierung von ANP und BNP kaum beschrieben und es stellt sich die Frage, wie stark tatsächlich der Zusammenhang zwischen Zellstress und Entstehung der Herzinsuffizienz ist. Haben ROS einen regulativen Einfluss auf den Zellkern und die epigenetische Regulation? Da in chronischen TAC-Tieren ein eindeutig erhöhter nukleärer Export von HDAC4 beobachtet werden konnte, gingen wir der Frage nach, ob oxidatives Stress ein möglicher Auslöser dieser epigenetischen Regulation des fetalen Genprogramms sein könnte. Zur Detektion von oxidiertem HDAC4 führten wir einen Pulldown Assay durch. Für diesen Versuch wurden Mäuseherzen 30 min. lang in einer Langendorffanlage mit 1 mM Wasserstoffperoxid (H_2O_2) perfundiert. Die Kontrollgruppe wurde dementsprechend 30 min. lang mit 1N Tyrode gespült. Linksventrikuläres Myokard wurde in einem Pulldown-Assay analysiert, wobei ungebundene, freie Cysteinreste in HDAC4 markiert und präzipitiert werden, anschließend mit Western Blot weiterverarbeitet um die Proteinexpression von oxidiertem HDAC4 zu messen. Als

Resultat ließ sich vermehrt oxidiertes HDAC4 gegenüber den Kontrollen nachweisen (Abb. 12).

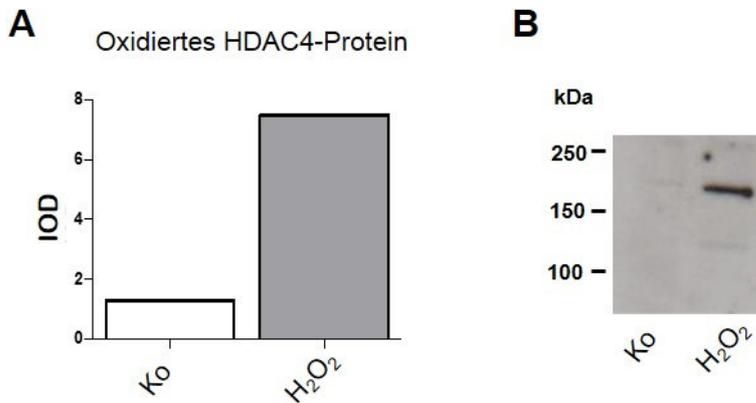


Abb. 12: Western Blot Analyse von oxidiertem HDAC4 Protein in murinen Herzgeweben nach Pulldown-Experimenten.

- A) Die Herzen wurden in einer Langendorffanlage 30 min. lang entweder mit 1mM Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder 1 N Tyrode (Ko) perfundiert.
- B) Repräsentative Western Blot-Analyse von oxidiertem HDAC4-Protein (n=1).

4.5 Einfluss oxidativen Stresses auf den nukleären Export von HDAC4

Um festzustellen, ob H_2O_2 als kurzzeitig einwirkendes Signalmolekül einen Einfluss auf die Regulation des HDAC4-Transportes und die Aktivität der fetalen Gene ANP und BNP hat, untersuchten wir zunächst den Einfluss von H_2O_2 in linksventrikulärem Myokard. Hierzu perfundierten wir Mäuseherzen 30 Minuten lang in einer Langendorffanlage, eine Gruppe mit 1 mM H_2O_2 um oxidativen Stress in den Herzzellen zu erzeugen und die andere als Kontrollgruppe mit 1N Tyrode. Um zu verifizieren, ob die bearbeiteten Herzgewebe tatsächlich zellulärem oxidativen Stress ausgesetzt waren, wurden Western Blot-Versuche mit einem spezifischen Antikörper gegen die oxidierte Form von Peroxiredoxin (Peroxiredoxin- SO_3) durchgeführt. Mittels dieses Markers lässt sich der Redoxstatus in den Zellen abschätzen. Tatsächlich konnten wir mittels Gesamtlyse in den mit H_2O_2 perfundierten Herzgeweben ein erhöhtes Maß an Peroxiredoxin- SO_3 messen (Abb. 13 A). Mit der Methode der cytosolisch-nukleären Fraktionierung bestimmten wir die Lokalisation von HDAC4 in Western Blot-Versuchen (Abb 13 B,C,D). Im Vergleich zu den Kontrollen ist unter der Einwirkung von oxidativem Stress kein erhöhter nukleärer Export erfolgt. Um zu

prüfen, ob akuter oxidativer Stress mit der Reaktivierung fetaler Gene assoziiert ist, untersuchten wir in den gleichen Geweben die ANP- und BNP-Expression mittels Real-Time PCR (Abb. 13 E,F). Unsere Daten zeigen, dass die mRNA der beiden Gene keiner Expressionsänderung unterlag.

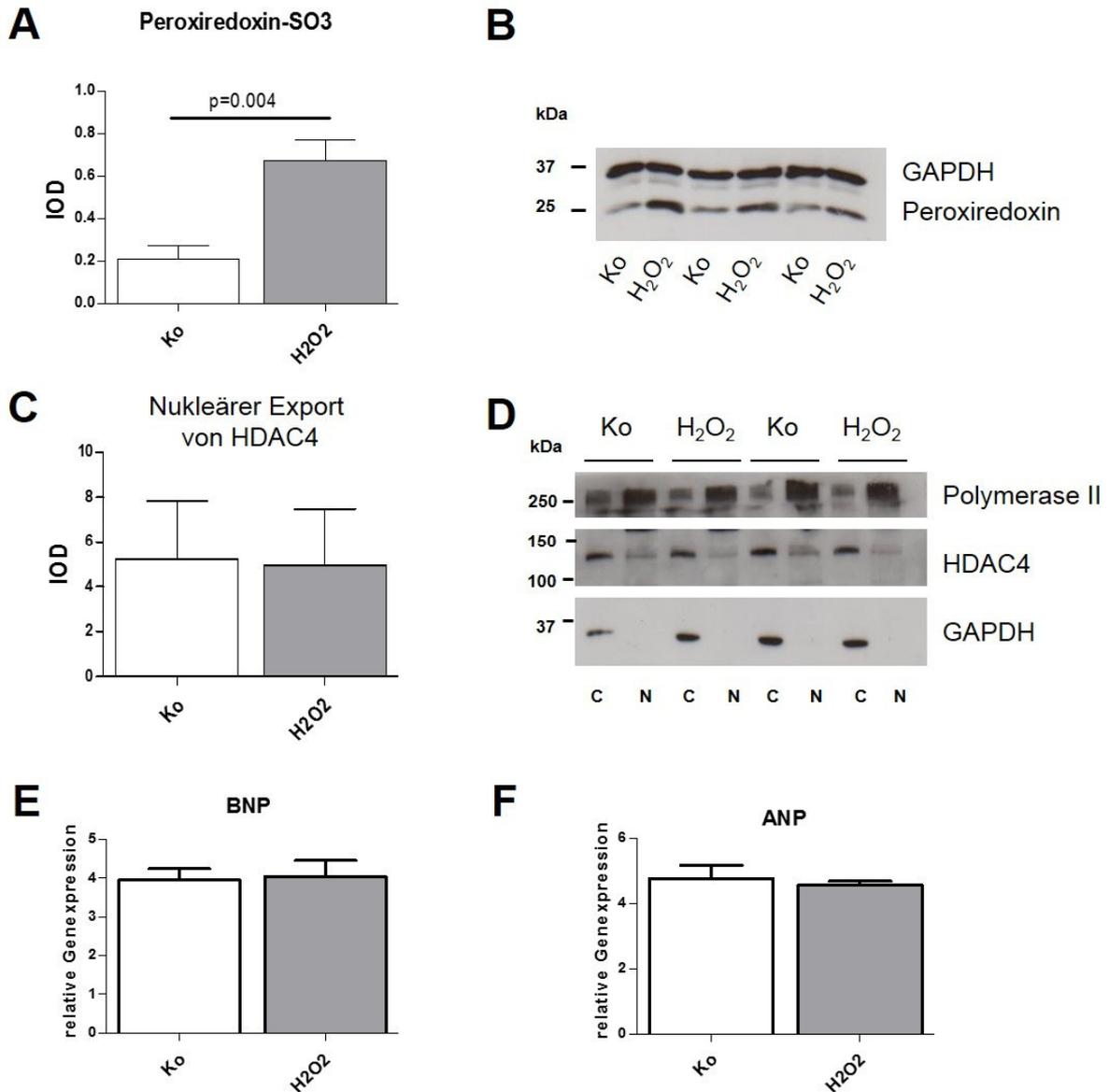


Abb. 13: Analyse von murinen Herzgeweben nach 30 minütiger 1mM Wasserstoffperoxid (H₂O₂)- oder 1N Tyrode (Ko)-Perfusion in der Langendorffanlage (n=5)

- A)** Western Blot Analyse zur Bestimmung von Peroxiredoxin-SO₃ (Prdx- SO₃) nach Applikation von H₂O₂ (1 mM) oder Vehikel (Kontrolle).
- B)** Repräsentativer Western Blot Analyse von Prdx-SO₃ und GAPDH.
- C)** Western Blot Analyse von HDAC4. Cytosolisch-nukleäre Fraktionierung zum Nachweis der Lokalisation von HDAC4

- D) Repräsentativer Western Blot-Analyse einer cytosolisch-nukleären Fraktionierung zum Nachweis der Lokalisation von HDAC4, Polymerase II und GAPDH.
- E) +F) Real-Time PCR Analysen der fetalen Gene ANP und BNP in gestressten- und in Kontrollherzen.

C=Cytosol, N= Nukleus

4.6 Einfluss akuter Nachlasterhöhung im Working Heart-Modell auf den nukleären Export von HDAC4

In dieser Versuchsreihe wurden Mäuseherzen in der Working Heart-Anlage einem Anstieg der Nachlast von 80 auf 120 mmHg für 15 min ausgesetzt. Die Kontrollen wurden bei einer physiologischen Nachlast von 80 mmHg gehalten. Ziel dieses Versuches war es mit dieser akuten Stresseinwirkung auf das Herz einen oxidierten Redoxstatus in den Zellen zu erzeugen und zu prüfen, ob dies eine Auswirkung auf die Translokation von HDAC4 und somit auf die Genaktivität von ANP und BNP hat. Anhand der Westernblot-Ergebnisse (Abb. 14 D-F) sehen wir keine Regulation von HDAC4 und wir konnten keine Oxidation messen (Abb. 14 A). Zum einen untersuchten wir die Lokalisation von HDAC4 nach dem Protokoll der cytosolisch-nukleären Fraktionierung und die Ergebnisse zeigen keine Änderung der Protein-Translokation im Vergleich zu den Kontrollen. Zum anderen zeigt sich in den Western Blot-Analysen nach Gesamtlyse keine relevante Erhöhung des Oxidationsmarkers Peroxiredoxin-SO₃ (Prdx-SO₃) in den stressinduzierten Nachlast-Herzen (NL) gegenüber den Kontrollen. Zusätzlich zeigen die Real-Time PCR Analysen der fetalen Gene ANP und BNP keinen Unterschied in der mRNA-Expression zwischen den gestressten- und den Kontrollherzen (Abb. 14 B, C).

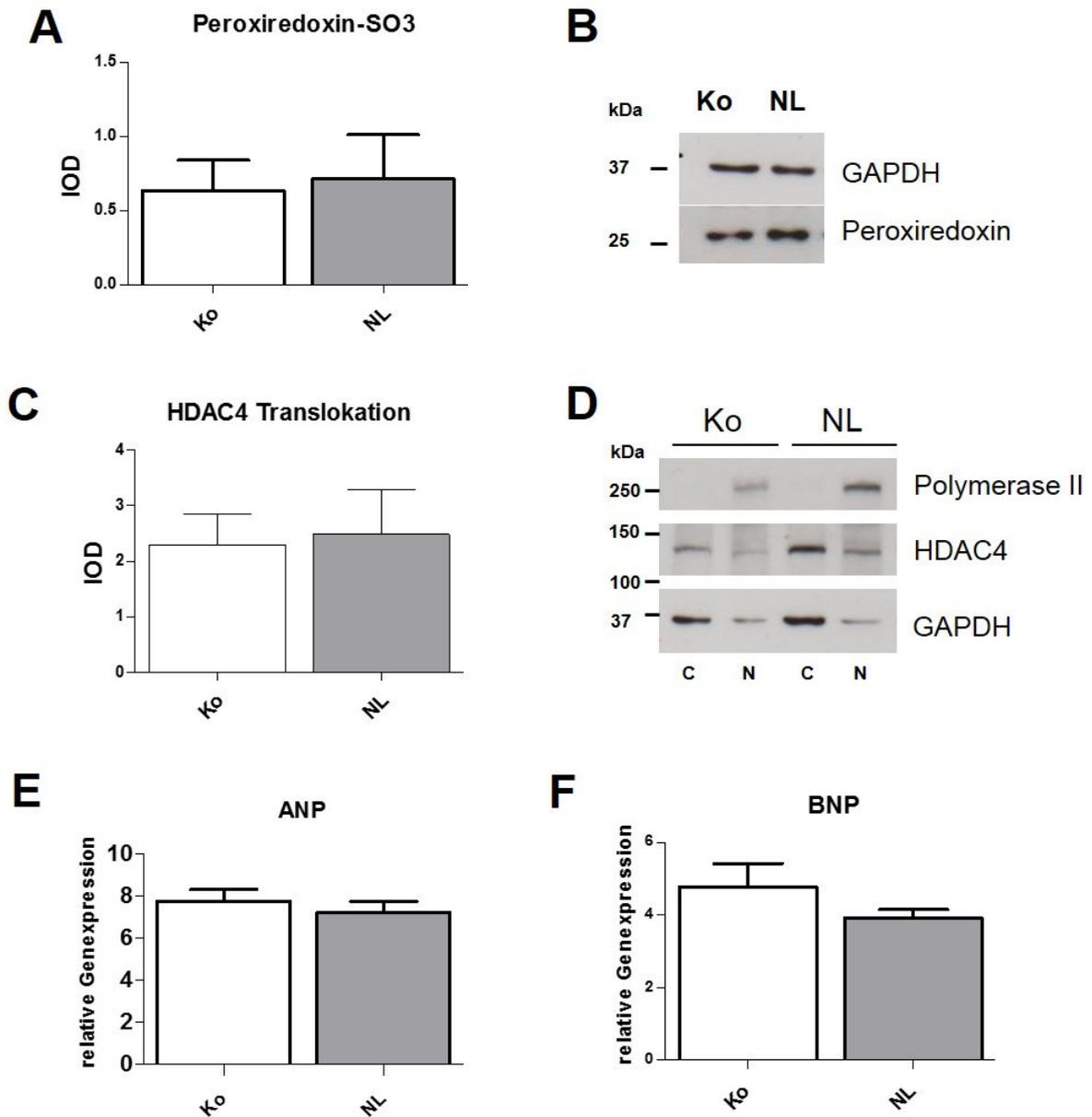


Abb. 14: Analyse von murinen Herzgeweben im Working Heart Modell nach 15 min. erhöhter Nachlast (NL) und Kontrolle (Ko) (n=5)

- A)** Western Blot nach Gesamtlyse zum Nachweis von Peroxiredoxin-SO₃ (Prdx-SO₃) in Nachlast- Herzen (NL) gegenüber den Kontrollen.
- B)** Repräsentativer Western Blot-Analyse von Prdx- SO₃ und GAPDH.
- C)** Western Blot Analyse von HDAC4 Protein mit cytosolisch-nukleärer Fraktionierung zum Nachweis der Lokalisation von HDAC4 in Nachlast- Herzen (NL) gegenüber den Kontrollen.
- D)** Repräsentative Western Blot-Analyse nach einer cytosolisch-nukleären Fraktionierung zum Nachweis von HDAC4, Polymerase II und GAPDH.
- E) +F)** Real-Time PCR Analysen der fetalen Gene ANP und BNP zwischen den Nachlast- Herzen (NL) und den Kontrollherzen. C=Cytosol, N= Nukleus

4.7 Einfluss von akuter TAC auf den HDAC4 –Export

Als weitere Versuchsreihe führten wir an Mäusen eine akute transaortale Verengung der Aorta (TAC) für 15 Minuten durch und verglichen diese mit Sham-operierten Tieren. Im Gegensatz zur Working Heart-Methode sind diese Herzen nicht vom neuroendokrinen System getrennt. Signalmoleküle, wie Noradrenalin, Adrenalin oder Komponenten des RAAS können in diesem Versuchsansatz den Transport von HDAC4 beeinflussen. Nach Euthanisierung der Tiere wurden die Herzen entnommen und das Gewebe einer Gesamtlyse zur Gewinnung der Proteine unterzogen. Zunächst wurde der Redoxstatus des Myokards durch Western Blot-Experimente gegen oxidiertes Peroxiredoxin (Prdx-SO₃) bestimmt. Die Western Blot Ergebnisse nach Gesamtlyse zeigten keine signifikante Erhöhung von Prdx-SO₃ in den nach Nachasterhöhung gegenüber den Kontrollen (Sham) (Abb. 15 A). Auch die Analyse der cytosolischen und der nukleären Proteinfraction von HDAC4 in Western Blot-Analysen zeigten, dass dessen Export im akuten TAC-Modell unbeeinflusst bleibt. Die Ergebnisse zeigen keine Änderung der Protein-Translokation, der nukleäre Export ist im Vergleich zu den Kontrollen unverändert gleich hoch (Abb.15 A-C). Auf die Analyse der Genexpression von ANP und BNP wurde daraufhin verzichtet.

Aus unseren Daten lässt sich schliessen, dass REST keiner Regulation im menschlichen Herzen unterliegt. Jedoch scheint die Signal-responsive Histon-Deacetylase HDAC4 an der Regulation der fetalen Gene ANP und BNP, während der Entstehung einer Herzinsuffizienz (hier im chronischen TAC-Modell gezeigt), beteiligt zu sein. Die Ergebnisse dazu sind in der Dissertation von Frau Sarah Müller und in unserem Paper „HDAC4 controls histone methylation in response to elevated cardiac load“, Hohl et al, JCI 03/2013 festgehalten. Unsere Akut-Experimente in der Maus machten jedoch deutlich, dass eine kurzzeitige Erhöhung des oxidativen Stresses oder einer Erhöhung der Nachlast nicht ausreichend war, um einen messbaren nukleären Export von HDAC4 zu erreichen.

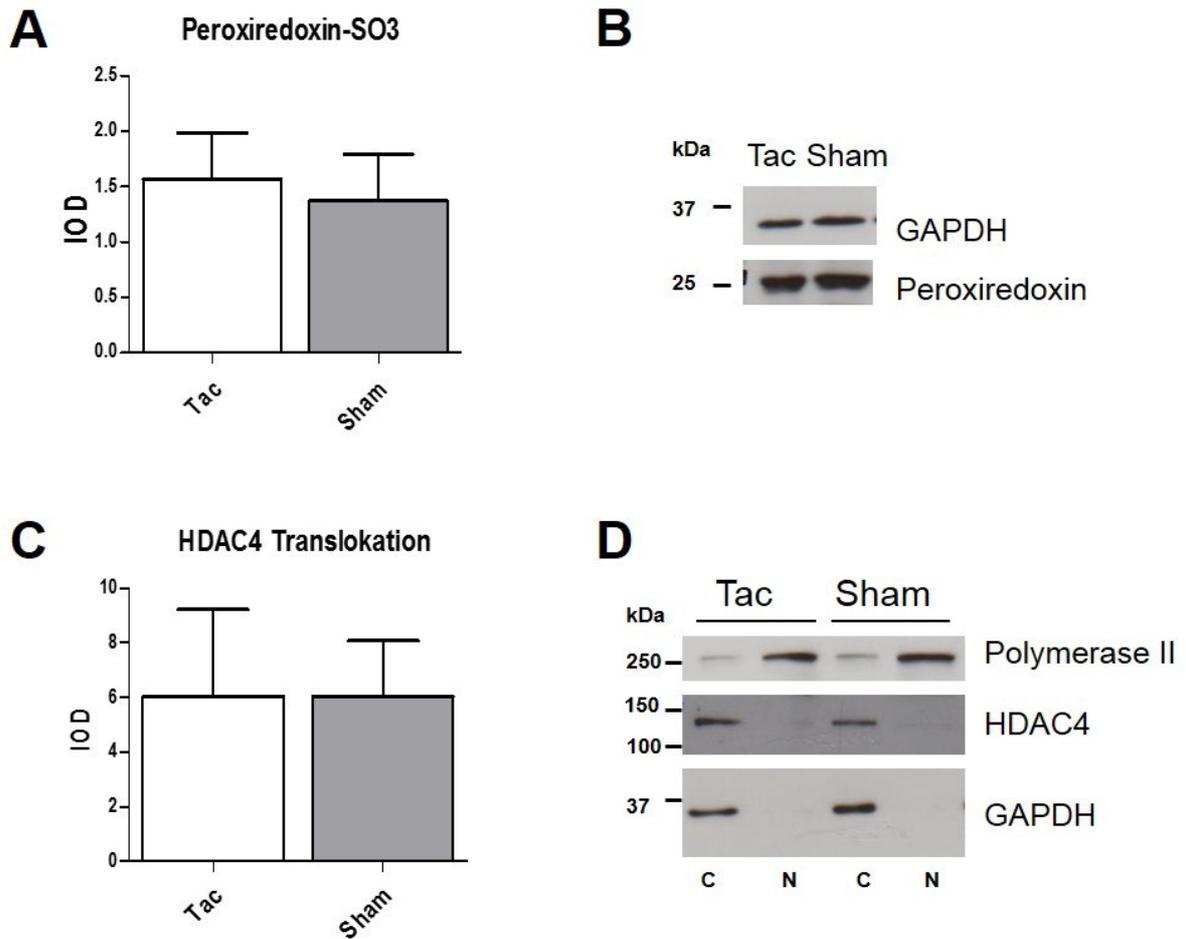


Abb. 15: Analyse von murinen Herzgeweben im TAC-Modell nach 15 min. (n=6)

- A)** Western Blot nach Gesamtlyse zum Nachweis von Peroxiredoxin-SO₃ (Prdx- SO₃) in den stressinduzierten TAC-Herzen gegenüber den Kontrollen (Sham).
- B)** Repräsentative Ergebnisse einer Western Blot-Analyse von Prdx- SO₃ und GAPDH.
- C)** Western Blot Analyse von HDAC4 Protein mit cytosolisch-nukleärer Fraktionierung zum Nachweis der Lokalisation von HDAC4 in Tac-Tieren und in Sham-operierten Tieren
- D)** Repräsentative Ergebnisse einer cytosolisch nukleären Western Blot-Analyse von HDAC4, Polymerase II und GAPDH.
C=Cytosol, N= Nukleus

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Erforschung epigenetischer Regulationsmechanismen und deren Einfluss auf die Entstehung einer Herzinsuffizienz. Im Fokus steht hierbei die Reaktivierung des fetalen Genprogrammes, mit der Frage, welchen regulatorischen Einfluss der Transkriptionsfaktor REST und die Histondeacetylase 4 (HDAC4) als Repressorproteine auf die Expression fetaler Gene haben, zu denen u.a. die natriuretischen Proteine ANP und BNP, die als Biomarker für die Herzinsuffizienz-Diagnostik einen wichtigen Verlaufsparemeter darstellen, gehören.

5.1 Die Rolle von REST in humanem Myokardgewebe

In dieser Arbeit wurde erstmals die Bedeutung des RE1 Silencing Transkriptionsfaktor (REST) im Zusammenhang mit der Reaktivierung des fetalen Genprogrammes in menschlichem Myokard untersucht. REST oder auch NRSF (Neuronen-restriktiver silencer Faktor) genannt, wurde zuerst in seiner Funktion als Masterregulator neuronaler Gene in nicht neuronalen Geweben beschrieben (*Chong JA et al., 1995; Schoenherr CJ et al., 1996*). REST, das auch im Myokard exprimiert wird (*Palm K et al., 1998*), bindet an einer spezifischen DNA-Bindesequenz namens NRSE (neuron restricted silencer element) (*Kraner et al., 1992*). Hier bildet der Transkriptionsfaktor zusammen mit anderen Korepressoren einen Multiproteinkomplex aus, über den das Repressorprotein seine repressiven Histon-Modifikationen an der regulatorischen Region seiner Zielgene vermittelt (*Kuwahara K et al., 2001; Ogawa E et al., 2002*). Zu diesen NRSE-tragenden Zielgenen gehören die fetalen Gene ANP, BNP, alpha-skeletal aktin (α -Ska) sowie die fetale Ionenkanäle CACNA1H und CACNA1C (*Kuwahara K et al., 2003; Nakagawa Y et al., 2006*). Im Zuge einer entstehenden Herzinsuffizienz werden diese Gene, die im gesunden Herzen abgeschaltet vorliegen, re-exprimiert. *In vitro* Experimente in der Zellkultur zeigten, dass diese Reaktivierung mit einer gleichzeitigen Herunterregulation der REST-mRNA einhergeht und somit ein inverses Verhältnis zwischen dem Repressor und seinen Zielgenen vorliegt (*Kuwahara K et al., 2003*). Zudem wurde im transgenen Mausmodell gezeigt, dass die Überexpression einer dominant-negativen REST-Mutante ebenfalls zu einer erhöhten fetalen Genexpression im Myokard führte. Echokardiographische Untersuchungen in

diesem Mausmodell weisen zudem eine schwere linksventrikuläre Dysfunktion und eine dilatative Kardiomyopathie auf. Zusätzlich führten Kuwahara et al. zweiwöchige TAC-Experimente durch, ein Modell, mit dem eine chronische Nachlasterrhöhung induziert wird. So konnte ebenfalls eine inverse Korrelation zwischen der Expression der fetalen Gene und REST nachgewiesen werden. Eine Heraufregulation von BNP war mit einer gleichzeitigen Herabregulation von REST assoziiert. Aus diesen Daten wurde geschlossen, dass REST eine protektive Funktion im Rahmen der Herzinsuffizienzentstehung einnehmen könnte (Kuwahara K et al., 2003).

In diesem Zusammenhang interessierte uns zunächst die Rolle von REST im menschlichen Myokard und über welchen Mechanismus REST die Genaktivität des fetalen Genprogramms im Zuge einer Herzinsuffizienz reguliert. Unsere Ergebnisse zeigten eine signifikant erhöhte ANP- und BNP-Expression im menschlichen insuffizienten Myokard. Dies ging jedoch nicht mit einer Herabregulation oder einer veränderten Lokalisation des Repressorproteins REST einher. Zudem zeigten unsere Resultate der Chip-Assay Experimente, dass REST im insuffizienten Myokard nicht vermindert an der NRSE-Bindestelle seiner Zielgene gebunden vorlag und somit als Repressor immer noch aktiv sein könnte. Im Gegensatz zur Arbeit von Kuwahara (2003) zeigen unsere Daten eine leichte Zunahme der REST-Expression im Myokard der insuffizienten Herzen. Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen von Toischer et al. (*Circulation* 2010), dessen Vergleich der Expressionsprofile zwischen Sham und TAC-Mäusen ebenfalls eine 1,68-fache Heraufregulation der REST-mRNA in den TAC-Tieren beobachtete, bei einer gleichzeitigen Heraufregulation von ANP.

In dieser Arbeit untersuchten wir zusätzlich die Expression des bekannten REST-Zielgens Synapsin I. Die Transkription von Synapsin I wird in nicht-neuronalem Gewebe von REST verhindert. In Neuronen, in denen die Konzentration von REST sehr gering ist, wird Synapsin I hingegen stark exprimiert (Schoch et al., 1996). Sollte die REST-vermittelte Repression im insuffizienten Myokard vermindert sein, so könnte die Genexpression von Synapsin I ebenfalls reaktiviert werden. Passend zur unveränderten REST-Konzentration zeigten unsere Daten keine gesteigerte Genaktivität von Synapsin I im erkrankten Myokard. Dies spricht für eine unveränderte Repression von Synapsin I sowie für eine REST-unabhängige Reaktivierung des

fetalen Genprogramms. Diese Beobachtung wird gestützt durch eine genauere *in vivo*-Analyse der ANP-Promotorregion durch Horsthuis et al. (2008) im Maus TAC-Modell, die keine essentielle Funktion der REST-Bindestelle NRSE bei der Stress-induzierten Reaktivierung von ANP zeigte.

Da weder der Expressionslevel von REST noch die Bindung von REST an die DNA eine Rolle bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz zu spielen scheint, interessierte uns der durch REST vermittelte Repressionsmechanismus. REST bildet mit seinen Korepressor-Proteinen einen Multiproteinkomplex aus, der als Silencer der Genexpression an der DNA gebunden vorliegt. Über die Korepressoren mSin3 und CoREST können Histon-modifizierende Proteine, wie die Klasse I Histon-Deacetylasen (HDAC1 und 2) sowie die Histon-Methyltransferasen G9a und SUV39H1 an die Transkriptionseinheit herangeführt werden (Ooi L und Wood IC, 2007). Mittels dieses Proteinkomplexes könnte REST die Repression seiner Zielgene im gesunden Myokard aufrechterhalten. Nakagawa et al (2006) beschrieb zudem, dass die Signal-responsive Klasse II Histon-Deacetylase 4 (HDAC4) durch REST rekrutiert wird. Somit stünde REST ein CaMKII-abhängiger Regulationsmechanismus zur Verfügung.

5.2 Der Export von HDAC4 korreliert mit Reaktivierung von ANP und BNP infolge chronischer Nachlasterrhöhung

Die Bedeutung von HDAC4 für die Entstehung der Herzinsuffizienz und die damit zusammenhängenden Regulationsmechanismen wurden mittlerweile eingehend beschrieben, waren aber zu Beginn dieser Arbeit noch nicht ganz verstanden. Im gesunden Herzen ist HDAC4 vorwiegend im Nukleus lokalisiert. Dort bildet es mit Transkriptionsfaktoren, wie REST oder Myocyte enhancer factor 2 (MEF2) einen Multiproteinkomplex aus und wird so an spezifische DNA-Regionen rekrutiert, die u.a. für fetale Gene kodieren (Zhang CL et al., 2002; Nakagawa Y et al., 2006). Solange HDAC4 am Transkriptionsfaktor MEF2 gebunden vorliegt, wird die Expression prohypertropher Gene verhindert. Wird aber HDAC4 in das Cytosol abtransportiert und stattdessen interagiert die Histonacetyltransferase p300 mit MEF2, führt dies zu einer transkriptionellen Aktivierung der prohypertrophen Gene. Es wurde beschrieben, dass MEF2 infolge von pathophysiologischem Stress im Herzen hochreguliert ist und dass neben HDAC4 alle Klasse II HDACs, die eine MEF2-Bindedomäne beinhalten, mit

MEF2 interagieren (*Zhang CL et al., 2002; Lu J et al., 2000; Verdin E et al., 2003; Backs J et al., 2006; Bush W und McKinsey TA, 2009; Haberland M et al., 2009*).

Kommt es im Rahmen der kardialen Dysfunktion zur anhaltenden neuroendokrinen Aktivierung, z.B. durch Stimulation von beta1-Adrenozeptoren, führt dies zur Aktivierung Calcium-Calmodulin abhängiger Kinase II (CaMKII)-vermittelter Signalwege (*Sucharov CC et al., 2006*) und zur CaMKII-abhängigen Phosphorylierung der Signal-responsiven Histondeacetylasen. Diese Phosphorylierung hat den nukleären Export der HDACs zur Folge, was letztendlich die Repression fetaler Gene aufhebt (*Zhang CL et al., 2002; Backs J et al., 2006*). Auf Grund dieser Erkenntnisse sollte in einem chronischen Stressmodell, der transversen Aortenkonstriktion (TAC), im Mausherzen die Regulation von HDAC4 untersucht werden. Dies führte nach 6 Wochen zu einer ausgeprägten Hypertrophie des Herzen, gemessen am HW/BW Ratio und einer Aktivierung der fetalen Gene ANP und BNP. Diese Reaktivierung war jedoch nicht durch eine Herabregulation des Repressorproteins REST mediiert, sondern ging mit einem vermehrten Export von HDAC4 aus dem Nukleus ins Cytosol einher. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen verschiedener Arbeitsgruppen, welche den cytonukleären Transport von HDACs in Herzzellen nach spezifischer Phosphorylierung, z. B. durch die CaMKII, beschrieben haben (*Verdin E et al., 2003; Backs J et al., 2008; Bush W und McKinsey TA, 2009*). Backs et al. (2008) konnten im Zellkulturmodell zeigen, dass in Zellen, in denen dauerhaft CaMKII aktiviert ist, ein erhöhter nukleärer Export der Klasse II HDACs aufgrund einer Phosphorylierung erfolgte. Zhang et al. bewiesen als erste, dass Klasse II HDACs als endogene Repressoren der kardialen Hypertrophie agieren. Sie zeigten im Zellkulturmodell, dass einerseits eine HDAC9 Überexpression zu einer kardialen Hypertrophie führt und andererseits ein HDAC9 Knockout mit einem kardialen Remodeling assoziiert ist. Des Weiteren untersuchten sie in TAC-operierten Mäusen die Umsetzung von HDACs mit Hilfe eines *in vitro* Kinase Assays, mit der die enzymatische Aktivität von HDAC4- und 5-Kinasen infolge hypertropher Stimuli gemessen werden konnte. Ihre Ergebnisse belegen das Auftreten einer kardialen Hypertrophie in den belasteten Tieren, die mit einer erhöhten HDAC-Aktivität einhergeht. Außerdem konnten sie feststellen, dass dieser Prozess mit einer Aktivierung der CaMKII verbunden ist. Nicht unerwähnt bleiben sollte auch ihre Genexpressions-Analyse der prohypertrophen Marker ANP und beta-MHC in

Kardiomyozyten, welche mit dem potent hypertroph wirkenden Phenylephrin stimuliert wurden. Hierbei konnten sie eine Heraufregulation der beiden Gene nachweisen. Somit erschließt sich ein Zusammenhang von Induktion hypertropher Stimuli, eine enzymatischen Aktivierung von HDAC4 und eine erhöhte Expression fetaler Gene (*Zhang CL et al., 2002*). Unsere Daten aus der Maus decken sich mit Beobachtungen von Calalb et al. (2009) in humanem Myokard. Diese konnten in humanen Herzen mit einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) zeigen, dass in diesen Geweben die Aktivität der CaMK erhöht war und dies mit einem verminderten Vorkommen von HDAC4 im Nukleus assoziiert war. Aus unseren Ergebnissen lässt sich demnach weder im humanen noch im Mausmyokard ein regulatorischen Einfluss des Repressors REST auf das kardiale Remodeling erkennen. Dafür zeigen unsere Resultate einen Zusammenhang zwischen dem Export von HDAC4 aus dem Nukleus und der Reaktivierung des fetalen Genprogrammes.

5.3 Akute Erhöhung von oxidativem Stress induziert nicht den Export von HDAC4

In Mäusen, die wir durch Aortenligatur einer erhöhten kardialen Nachlast aussetzten (sog. TAC Model), fanden wir eine Heraufregulation von ANP und BNP, was mit einer erhöhten Lokalisation von HDAC4 im Cytosol einherging. Da es sich bei TAC um ein chronisches Modell handelt, beruht der Export von HDAC4 wahrscheinlich auf der durch die CaMKII-vermittelten Phosphorylierung, einem bekannten Signalweg für die Entstehung der Herzhypertrophie (*McKinsey TA et al., 2000*).

Eine weitere Säule dieser Arbeit stellte die Untersuchung eines von der Phosphorylierung unabhängigen, akuten Regulationsmechanismus von HDAC4, der ROS-induzierten Redoxregulation dar. Bisherige Studien zeigen, dass kardiale Remodelingprozesse und Pathomechanismen der Herzinsuffizienz redoxabhängig reguliert werden (*Cave AC et al., 2006; Murdoch CE et al., 2006*). Gerade ROS scheinen dabei als Signalmolekül eine bedeutende Rolle zu spielen und werden v.a. bei erhöhter hämodynamischer Last und G-Protein-gekoppelter Rezeptor-Stimulation, welche durch Angiotensin II oder Phenylephrin aktiviert werden, gebildet (*Griendling KK et al., 1994; Kwon SH et al., 2003*).

Ago et al. (2008) zeigen in ihrer Publikation, dass Thioredoxin 1 den cytonukleären Transport von HDAC4 über einen redoxabhängigen Mechanismus reguliert. Dazu

analysierten sie in Pulldown-Assays die Oxidation von HDAC4 in Kardiomyozyten, sowie immunohistochemisch den nukleären Export von HDAC4, indem er die Auswirkung von Phenylephrin (PE) in mehreren Zeitabschnitten erfasste. PE oxidiert freie Thiolgruppen, die reichlich in den Cysteinresten der Histondeacetylase vertreten sind. Diese Detektion der oxidierten Thiolgruppen lässt somit einen Rückschluss auf die Menge an oxidiertem HDAC4 in den Proben zu. Am ausgeprägtesten war der oxidative Effekt auf HDAC4 bereits in einem Zeitraum zwischen 5-30 min (*Ago et al., 2008*). Dies war mit einem Export von HDAC4 nach bereits fünf Minuten assoziiert und führte letztendlich zu einer erhöhten Expression des fetalen Gens ANP. Zudem konnten *Ago et al. (2008)* zeigen, dass der redoxabhängige Export von HDAC4 viel früher einsetzte als die CaMKII-vermittelte Phosphorylierung von HDAC4, die erst nach einer halben Stunde stattfand.

Da der zugrunde liegende Mechanismus bisher nur in Zellkulturen untersucht wurde (*Ago et al., 2008*) und zu Beginn dieser Arbeit noch weitgehend unverstanden war, sollte dieser mittels drei verschiedener Akut-Modelle am ganzen Organ, d.h. dem intakten Herzen untersucht werden, in denen jeweils ein kurzzeitiges Stresssignal auf das Myokardgewebe ausgeübt wurde. Um die Auswirkungen des oxidativen Zellstress auf den HDAC4 Transport zu untersuchen, bedienten wir uns zunächst der Langendorffanlage, in der die isolierten Herzen mit 1mM Wasserstoffperoxidlösung (H_2O_2) perfundiert wurden. Hierbei soll H_2O_2 als ROS Quelle dienen, um die Auswirkungen einer erhöhten ROS Konzentration auf den redoxabhängigen Export von HDAC4 analysieren zu können. H_2O_2 ist membranpermeabel und diffundiert in die Zelle ein. Somit ist es wahrscheinlich, dass H_2O_2 auch im Nukleus zu oxidativem Stress führen kann. Als Indikator einer erhöhten ROS-Last im Gewebe diente der Nachweis von oxidiertem Peroxiredoxin, einem wichtigen antioxidativen Enzym, welches die Zelle vor Schäden durch ROS schützen soll (*Matsushima S et al., 2006*). Hier konnten wir zeigen, dass eine 30 minütige H_2O_2 -Perfusion sowohl die Oxidation von Peroxiredoxin zu Peroxiredoxin- SO_3 katalysierte als auch die Oxidation von HDAC4 begünstigte. Dies war jedoch nicht mit einem Export von HDAC4 in das Cytosol verbunden. Dies spiegelte sich auch in den unveränderten Expressionen der fetalen Gene ANP und BNP wieder. Möglicherweise war die Wahl der H_2O_2 -Konzentration (1 mM) nicht optimal gewählt, da das Molekül konzentrationsabhängig entweder prohypertroph (10-30 μ M) oder proapoptotisch wirkt (*Kwon SH et al., 2003*). Allerdings

zeigen unsere Daten, dass es durch 1 mM tatsächlich zu einer Oxidation von HDAC4 als auch Prx-SO₃ kam, so dass wir im Prinzip auch die daraus resultierende nukleäre Translokation hätten messen müssen, sofern diese stattfindet. Als Positivkontrolle hatten wir tatsächlich einen nukleären HDAC4 Export nach TAC beobachtet.

In zwei weiteren Versuchsansätzen mit isolierten Maus Herzen in der Working Heart-Anlage bzw. einer transversen Aortenkonstriktion (TAC) *in vivo*, sollte die Hypothese getestet werden, ob eine 15 minütige Erhöhung der Nachlast zu einer Oxidation des Redoxstatus und somit zu einer Oxidation von HDAC4 kommt. Diese akute Anhebung der kardialen Last sollte aufgrund einer erhöhten Arbeitsleistung des Myokards in einer zunehmenden Produktion von H₂O₂ resultieren. Unsere Resultate zeigten, dass die Menge an Peroxiredoxin-SO₃ trotz erhöhter Arbeitslast nicht zunahm. Auch konnten wir keine akute redoxabhängige Regulation durch ROS auf den nukleären Export von HDAC4 nachweisen. Es stellt sich die Frage, ob die gewählten Ansätze optimal waren, um genügend oxidativen Stress in den Herzen zu erzeugen, der für einen HDAC4 Export aus dem Nukleus erforderlich wäre. In früheren Versuchen in unserer Arbeitsgruppe konnten wir schon nach 30 min. einen erhöhten HDAC4-Transport nachweisen (Hohl M *et al.*, 2013). Dies könnte dafür sprechen, dass die Zeit in der Working Heart Anlage zu kurz gewählt war. Es ist ebenso möglich, dass die durch die vermehrte Arbeit entstandenen ROS bereits durch andere Puffersysteme entgiftet wurden oder die Zellen noch genügend antioxidative Ressourcen zur Verfügung hatten, um den oxidativen Stress abzuf puffern und es somit zu keiner Oxidation von HDAC4 kommen konnte.

Was die TAC-Methode betrifft, scheint es vielleicht ebenso, dass die gewählte Zeit zu kurz war, um einen Effekt zu sehen. Es ist unbekannt wie lange es tatsächlich dauert, bis ein so hoher oxidativer Zellstress entsteht, dass die Kapazität der Puffersysteme mit der Entgiftung von ROS ausgelastet ist und sich so ROS in der Zelle anreichert. Ein wesentlicher Unterschied zu Agos Versuchen (2008) besteht darin, dass er die Ergebnisse in Zellkulturexperimenten mit PE-Behandlung erzielte, wir jedoch *in-vivo* Versuche in Herzgeweben durchführten. Somit bieten sich auch andere Bedingungen in den Zellen und weitere Einflüsse, die in Zellkultur nicht vorhanden sind. In der Zellkultur kann man meistens sehr gut Regulationsmechanismen nachweisen, da dort

immer die gleichen Bedingungen vorherrschen, aber so gewonnene Erkenntnis lassen sich nicht einfach in die *in-vivo* Situation übertragen.

Unsere Ergebnisse können somit keinen Nachweis darüber bringen, ob die von Ago et al. beobachtete Regulation von HDAC4 durch Redoxmechanismen von Relevanz *in vivo* bzw. in einem Krankheitsmodell ist.

5.4 Klinische Bedeutung und Ausblick

Die Entstehung der Herzinsuffizienz ist multifaktoriell bedingt und wie man heute weiß, spielen Mechanismen der Genregulation dabei eine Schlüsselrolle. Die bekannten Risikofaktoren, die zunächst eine Herzerkrankung auslösen, spielen somit nicht alleine die Rolle, sondern das Zusammenwirken der genetischen Ressourcen und äußeren Umweltfaktoren, die individuell variieren, entscheiden. Wenn die Diagnose Herzinsuffizienz gestellt wird, handelt es sich immer noch um eine meist unheilbare Erkrankung mit infauster Prognose und häufigen Krankenhausaufenthalten. Gründe für diesen schwerwiegenden Verlauf liegen darin, dass die Entstehung der Erkrankung noch nicht vollends geklärt und die Therapie bislang begrenzt ist.

Die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) bewirkt ein neuroendokrines Remodeling mit Folge der Linksherzhypertrophie, welche einhergeht mit erhöhten ANP- und BNP-Konzentrationen. Diese Proteine sind Ausdruck der Reaktivierung des fetalen Genprogramms des Herzens und sind Biomarker für die Herzmuskelschwäche. Durch die Hypertrophie verbraucht das Herz im Laufe der Zeit so viel Kraft, dass sich im weiteren Verlauf eine Dilatation mit einer Linksherzschwäche ausbildet. Die Höhe der fetalen Proteinexpression von ANP und BNP korreliert dabei mit der Schwere der Erkrankung (*Gottlieb SS et al., 1998; Hasebe N et al., 1995; Tsutamoto T et al., 1997*). Die Ausschüttung von ANP und BNP korreliert mit der transmuralen Wandspannung, was u. a. durch die kardiale Vorlast und Nachlast bedingt ist, die wiederum mit der kontraktilen Funktion des Herzens korreliert. Daher sind ANP und BNP auch prognostische Indikatoren der Erkrankung. Die Regulierung der fetalen Gene während der Entstehung der Herzinsuffizienz und die dazugehörigen epigenetischen Regulationsmechanismen sind noch nicht vollständig geklärt und darum ist es von großer Bedeutung, diesen Mechanismen weiter auf den Grund zu gehen, um potentiell neue und wirksamere Therapien zu entdecken.

In der vorliegenden Arbeit wurden neue epigenetische Mechanismen der Transition der Myokardhypertrophie in die chronische Herzinsuffizienz untersucht. Im Focus standen die Transkriptionsfaktoren REST und HDAC4, bekannte Repressoren des fetalen Genprogrammes. Außerdem wurde die Rolle von ROS im Zusammenhang mit dem kardialen Remodeling durch HDAC4 untersucht. Die zentralen Erkenntnisse der Arbeit bestanden darin, dass REST an der Entstehung der Herzinsuffizienz nicht beteiligt zu sein scheint, während HDAC4 eine große Bedeutung, insbesondere bei der chronischen Herzinsuffizienz, zukommt. Damit ergibt sich die Möglichkeit, dass pharmakologische Modulatoren der HDACs einen Einfluss auf die Entstehung und Progression der Herzinsuffizienz nehmen könnten.

Eine der ersten Schritte in der Entwicklung der HDAC-Inhibitoren gegen die Herzinsuffizienz sind z.B. das unspezifisch wirkende Trichostatin A (TSA). Kong et al. (2006) konnten eine Abnahme des kardialen Remodelings und eine Verbesserung der systolischen linksventrikulären Funktion in TAC-Mäusen nachweisen. Jedoch konnte sich TSA aufgrund von erheblichen Nebenwirkungen klinisch nicht behaupten. Eine aktuelle Studie konnte die Wirksamkeit des neuen HDAC-Inhibitors (HDACi) MPT0E014 in herzinsuffizienten Ratten nachweisen (Kao YH et al., 2013). Dabei verabreichten sie den Tieren das Medikament entweder subkutan, i.v. oder oral und führten echokardiographische, histologische und biochemische Analysen durch. Die Ergebnisse zeigten eine verbesserte kardiale Kontraktilität, ein abgeschwächtes kardiales Remodeling in Isoproterenol-induzierten DCM-Herzen und niedrigere ANP-Level. Wenn dieses Medikament nun die klinischen Phasen übersteht, wäre das eine große Hoffnung für die Herzinsuffizienztherapie (McKinsey TA, 2012).

HDAC Inhibitoren sind aber vor allem auch in anderen Erkrankungen stark erforscht und was die therapeutische Anwendung anbelangt, schon weiter fortgeschritten, wie in der Krebstherapie. Der von der FDA (*Food and Drug Administration, USA*) für T-Zell Lymphome neu zugelassenen HDACi Vorinostat (Zolinza) und Romidepsin (Istodax) sind hoffnungsvolle Vorreiter eines neuen hoffnungsvollen Therapieprinzips in der Onkologie. Zurzeit laufen mehr als 100 Studien, welche die Wirksamkeit der HDAC-Inhibitoren in Krebserkrankungen überprüft (www.clinicaltrials.gov).

Eine weitere Arbeit (*Kong HS et al., 2012*) zeigt, dass ein Klasse II- HDAC-Inhibitor, YK-4-272, den nukleären Export von HDAC verhindert. Diese Untersuchungen wurden zunächst experimentell in Tumorzellen gesichert und in präklinischen Studien die Bioverträglichkeit in Mäusen getestet. Die Ergebnisse deckten auf, dass der Inhibitor biostabil und gut oral applizierbar ist, außerdem konnte ein Wachstumsstopp von Tumor- und Krebszellen entdeckt werden. Die Anwendung richtet sich hierbei bislang auf die Tumorthherapie aus, aber Studien an Herzpatienten könnten in der Zukunft folgen. Wie man sieht, ist die Bedeutung von HDAC4 translational, einerseits für das Verständnis und Entwicklung von Therapieansätzen verschiedenster Erkrankungen.

Als letzten Punkt meiner Arbeit möchte ich die Rolle von oxidativen Stress, welcher als übermäßige ROS-Produktion im Vergleich zum antioxidativen Schutz definiert ist und seine Rolle in der Pathophysiologie kardialen Remodelings und der Herzinsuffizienz hervorheben. ROS verzeichnen durch vielfältige enzymatische Reaktionen unterschiedliche Auswirkungen. Neben Apoptose oder Zellschädigung sind sie auch in der Entwicklung von maladaptiven myokardialen Remodelingprozessen involviert, wovon einige ihrer Mechanismen in meiner Arbeit untersucht wurden. Redoxreaktive Vorgänge, wie das sogenannte „Redox-Signalling“, welches spezifische Signaltransduktionswege von ROS beschreiben, sind noch nicht komplett verstanden und es ist von großem Interesse diese Mechanismen aufzuklären, um die Entwicklung neuer und effektiver therapeutischen Strategien gegen die Herzschwäche zu ermöglichen.

Die ersten bedeutsamen klinischen Studien antioxidativ wirksamer Substanzen sind wohl die großen HOPE-Studien (Heart outcomes prevention evaluation) über Vitamin E (*Mann JF et al., 2004*) und Studien über Vitamin C. Vitamin E und C sind bekannt für ihre ausgeprägte antioxidative Wirkung in Zellen und darum wurden große Hoffnungen in diese Studien gelegt. Die Idee, dass die Antioxidantien ROS abfangen und somit freie Radikal-induzierte Kettenreaktionen verhindern, wurde in Patienten mit Herzschwäche untersucht, jedoch konnte kein relevanter Benefit herausgestellt werden (*Ghatak A et al., 1996*), im Gegenteil, es wurde gerade durch Tocopherolen (Vit. E) sogar ein erhöhtes Risiko an einer Herzinsuffizienz zu erkranken, beschrieben

(Mallat Z et al., 1998; Marchioli R et al., 2006). Dabei waren das schon die herausragenden und größten klinischen Studien mit antioxidativ wirksamen Substanzen bei Herzinsuffizienz, die bislang durchgeführt wurden und es ist ernüchternd, dass es bislang noch keine antioxidativen Strategien in Therapie der Herzinsuffizienz geschafft haben.

Eventuell könnte dabei ausschlaggebend sein, dass die bisherigen therapeutischen Ansätze nicht direkt gegen spezifische ROS-Quellen gerichtet waren. Aktuelle Studien beschäftigen sich daher mit subzellulär orientierten antioxidativen Therapien, die auf spezifische ROS-Quellen abzielen wie z.B. Mitochondrien und dabei auf Enzymen der Atmungskette Einfluss nehmen (Sheu SS et al., 2006; Zhang M et al., 2010; Burgoyne JR et al., 2012). Zu den vielversprechendsten Vertretern innovativer Therapiestrategien zählen Antioxidantien wie Mitoquinon (MitoQ) oder das Szeto-Schiller Peptid D-Arg-2'6'-dimethylTyr-Lys-Phe-NH₂ (SS-31).

MitoQ ist ein Ubichinonderivat und reichert sich mit Hilfe eines lipophilen Kations als Trägermolekül in den Mitochondrien an (Kelso GF et al., 2001; Smith RA et al., 2012). Ergebnisse in Tiermodellversuchen zeigen, dass das potente Antioxidanz in Herzen mit LV-Dysfunktion infolge Ischämie und Reperfusion (I/R) die kardiale Funktion signifikant verbessert (Adlam VJ et al., 2005) und sogar die Ausbildung von LV-Hypertrophie oder von Bluthochdruck senken konnte (Graham D et al., 2009). Erste Ergebnisse in klinischen Phase II Studien bei Parkinson- oder Hepatitis C-Patienten weisen bisher keine bedenklichen Nebenwirkungen auf, jedoch fehlt bislang noch die Erfahrung bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen (Smith RA und Murphy MP, 2010).

Das hoch potente und protektiv wirkende Antioxidanz SS-31 hingegen scheint sogar noch vielversprechender als MitoQ zu sein. Denn es braucht kein Trägermolekül zur mitochondrialen Aufnahme (Zhao K et al., 2004) und beeinflusst nicht die Zellatmung (Szeto HH, 2013), was bei Erkrankungen, die mit einem Energiedefizit wie der Herzinsuffizienz einhergehen, einen großen Vorteil darstellt. Studien in der Anfangsphase belegen, dass SS-31 die mitochondriale ROS-Produktion reduziert und eine protektive Wirkung in den Mitochondrien entfaltet (Zhao K et al., 2004). In

verschiedenen Tiermodellversuchen konnte ein Benefit von SS-31 bei Ischämie / Reperfusion, Bluthochdruck (*Dai DF et al., 2011*) und Herzinsuffizienz (*Dai DF et al., 2013; Szeto HH, 2013*) gezeigt werden. Auch diese Substanz hat schon den Einzug in die klinische Studienphase geschafft, aktuell in Phase II bei Patienten nach Myokardinfarkt, zurzeit liegen allerdings noch keine Resultate vor (*Chakrabarti AK et al., 2013*). Für Herzinsuffizienzpatienten mit erhaltener oder eingeschränkter Pumpfunktion ist für 2015 eine klinische Phase II Studie mit oraler Applikation von SS-31 geplant (*Szeto HH, 2013*).

Eine interessante neue Studie zeigt, dass Monoaminoxidasen (MAO), die Noradrenalin verstoffwechseln, ROS induzieren. MAO-Hemmer scheinen somit nicht nur relevant für die Therapie von Depressionen zu sein, sondern könnten auch einen kardioprotektiven Effekt haben (*Kaludercic N et al., 2011*). Darüber gibt es allerdings noch keine klinischen Erkenntnisse.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Einblick in die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz eine wichtige Voraussetzung dafür ist, neuartige Therapiestrategien zu entwickeln, die möglicherweise das maladaptive Remodeling eindämmen und die Symptome bzw. die Prognose der Patienten verbessern könnten. In dieser Hinsicht werden Einblicke in die epigenetische Regulation bei Herzinsuffizienz ermöglichen, neue Wege zur Beeinflussung der maladaptiven Remodeling Prozesse zu identifizieren.

6. Literaturverzeichnis

1. Adams JW, Sakata Y, Davis MG, Sah VP, Wang Y, Liggett SB, Chien KR, Brown JH, Dorn GW 2nd. Enhanced G alpha q signaling: a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 10140–10145.
2. Adlam VJ, Harrison JC, Porteous CM, James AM, Smith RA, Murphy MP, Sammut IA. Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *FASEB J*. 2005;19:1088-95.
3. Ago T, Liu T, Zhai P, Chen W, Li H, Molkentin JD, Vatner SF, Sadoshima J. A redox-dependent pathway for regulating class II HDACs and cardiac hypertrophy. *Cell*. 2008;133(6):978-93.
4. Allen RG und Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med*. 2000;28(3):463-99.
5. Anderson ME. Pathways for CaMKII activation in disease. *Heart Rhythm*. 2011;8(9):1501-3.
6. Andrés ME, Burger C, Peral-Rubio MJ, Battaglioli E, Anderson ME, Grimes J, Dallman J, Ballas N, Mandel G. CoREST: a functional corepressor required for regulation of neural-specific gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(17):9873-8.
7. Backs J, Olson EN. Control of cardiac growth by histone acetylation/deacetylation. *Circ Res*. 2006;98(1):15-24.
8. Backs J, Backs T, Bezprozvannaya S, McKinsey TA, Olson EN. Histone deacetylase 5 acquires calcium/calmodulin-dependent kinase II responsiveness by oligomerization with histone deacetylase 4. *Mol Cell Biol*. 2008;28(10):3437-45.
9. Backs J, Worst BC, Lehmann LH, Patrick DM, Jebessa Z, Kreusser MM, Sun Q, Chen L, Heft C, Katus HA, Olson EN. Selective repression of MEF2 activity by PKA-dependent proteolysis of HDAC4. *J Cell Biol*. 2011;195(3):403-15.
10. Bartunek J, Delrue L, Van Durme F, Muller O, Casselman F, De Wiest B, Croes R, Verstreken S, Goethals M, de Raedt H, Sarma J, Joseph L, Vanderheyden M, Weinberg EO. Nonmyocardial production of ST2 protein in human hypertrophy and failure is related to diastolic load. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 52(25):2166-74.
11. Belch JJ, Bridges AB, Scott N, Chopra M. Oxygen free radicals and congestive heart failure. *Br Heart J*. 1991; 65: 245–248.
12. Black B.L. und Olson E.N. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 1998;14:167–196
13. Block K, Eid A, Griendling KK, Lee DY, Wittrant Y, Gorin Y. Nox4 NAD(P)H oxidase mediates Src-dependent tyrosine phosphorylation of PDK-1 in response to angiotensin

- II: role in mesangial cell hypertrophy and fibronectin expression. *J Biol Chem.* 2008;283(35):24061-76.
14. Burgoyne JR, Mongue-Din H, Eaton P, Shah AM. Redox signaling in cardiac physiology and pathology. *Circ Res.* 2012;111:1091-106.
 15. Bristow MR. Why does the myocardium fail? Insights from basic science. *The Lancet.* 1998; Volume 352, Pages SI8 - SI14.
 16. Bush EW und McKinsey TA. Targeting histone deacetylases for heart failure. *Expert Opin Ther Targets.* 2009;13(7):767-84.
 17. Cai H und Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;87(10):840-4.
 18. Calalb MB, McKinsey TA, Newkirk S, Huynh K, Sucharov CC, Bristow MR. Increased phosphorylation-dependent nuclear export of class II histone deacetylases in failing human heart. *Clin Transl Sci.* 2009;2(5):325-32.
 19. Carmen GY und Víctor SM. Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal.* 2006:401-8.
 20. Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, Shah AM. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(5-6):691-728.
 21. Chakrabarti AK, Feeney K, Abueg C, Brown DA, Czyz E, Tendera M, Janosi A, Giugliano RP, Kloner RA, Weaver WD, Bode C, Godlewski J, Merkely B, Gibson CM. Rationale and design of the EMBRACE STEMI study: a phase 2a, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety, tolerability and efficacy of intravenous Bendavia on reperfusion injury in patients treated with standard therapy including primary percutaneous coronary intervention and stenting for ST-segment elevation myocardial infarction. *Am Heart J.* 2013;165:509-14 e7.
 22. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979;59(3):527-605.
 23. Chen K und Keaney JF Jr. Evolving Concepts of Oxidative Stress and Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Disease. *Curr Atheroscler Rep.* 2012;14(5):476-83.
 24. Chong JA, Tapia-Ramirez J, Kim S, Toledo-Aral JJ, Zheng Y, Boutros MC, Altshuler YM, Frohman MA, Kraner SD, Mandel G. REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell.* 1995;80: 949–957.
 25. Dai DF, Chen T, Szeto H, Nieves-Cintrón M, Kutuyavin V, Santana LF, Rabinovitch PS. Mitochondrial targeted antioxidant Peptide ameliorates hypertensive cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58:73-82.
 26. Dai DF, Hsieh EJ, Chen T, Menendez LG, Basisty NB, Tsai L, Beyer RP, Crispin DA, Shulman NJ, SZeto HH, Tian R, MacCoss MJ, Rabinovitch PS. Global proteomics and

- pathway analysis of pressure-overload-induced heart failure and its attenuation by mitochondrial-targeted peptides. *Circ Heart Fail.* 2013;6:1067-76.
27. Dreher D und Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer.* 1996;32A:30–8.
 28. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells. *J Leukoc Biol.* 1999;65(3):337-40.
 29. Ghatak A, Brar MJ, Agarwal A, Goel N, Rastogi AK, Vaish AK, Sircar AR, Chandra M. Oxy free radical system in heart failure and therapeutic role of oral vitamin E. *Int J Cardiol.* 1996; 57: 119–127.
 30. Gottlieb SS, Kukin ML, Ahern D, Packer M. Prognostic importance of natriuretic peptide in patients with chronic HF. *J Am Coll Cardiol.* 1989;13(7):1534-9.
 31. Graham D, Huynh NN, Hamilton CA, Beattie E, Smith RA, Cochemé HM, Murphy MP, Dominiczak AF. Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ10 improves endothelial function and attenuates cardiac hypertrophy. *Hypertension.* 2009;54:322-8.
 32. Griending KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994; 74: 1141–1148.
 33. Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet.* 2009; 10:32–42.
 34. Halliwell B. Tell me about free radicals, doctor: a review. *J R Soc Med.* 1989;82(12):747-52.
 35. Hasebe N, Hittinger L, Kohin S, Shen YT, Graham RM, Vatner SF. Effects of hypertrophy on left atrial and ventricular compliance and plasma ANF levels in conscious dogs. *Am J Physiol.* 1995;268(2 Pt 2):H781-7.
 36. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(10):1456-62.
 37. Hill MF und Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Am J Pathol.* 1996; 148: 291–300.
 38. Horsthuis T, Houweling AC, Habets PE, de Lange FJ, el Azzouzi H, Clout DE, Moorman AF, Christoffels VM. Distinct regulation of developmental and heart disease-induced atrial natriuretic factor expression by two separate distal sequences. *Circ Res.* 2008;102(7):849-59.
 39. Huang Y, Myers SJ, Dingledine R. Transcriptional repression by REST: recruitment of Sin3A and histone deacetylase to neuronal genes. *Nat Neurosci.* 1999;2(10):867-72.

40. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, Uchida K, Arimura Ki, Egashira K, Takeshita A. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res.* 1999;85(4):357-63.
41. Illi B, Gaetano C, Capogrossi MC. How senescent vascular cells lose their Clock age-dependent impairment of circadian rhythmicity in smooth muscle cells. *Circ Res.* 2006;98(4):450-2.
42. Jarvis RM, Hughes SM, Ledgerwood EC. Peroxiredoxin 1 functions as a signal peroxidase to receive, transduce, and transmit peroxide signals in mammalian cells. *Free Radic Biol Med.* 2012; 53(7):1522-30.
43. Johnson CA und Turner BM. Histone deacetylases: complex transducers of nuclear signals. *Sem in Cell&Develop Biology, Science.* 1999; 10(2):179-88.
44. Kaludercic N, Carpi A, Menabò R, Di Lisa F, Paolocci N. Monoamine oxidases (MAO) in the pathogenesis of heart failure and ischemia/reperfusion injury. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813(7):1323-32.
45. Kang SW, Rhee SG, Chang TS, Jeong W, Choi MH. 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications. *Trends Mol Med.* 2005;11 (12): 571–578.
46. Kao YH, Liou JP, Chung CC, Lien GS, Kuo CC, Chen SA, Chen YJ. Histone deacetylase inhibition improved cardiac functions with direct antifibrotic activity in heart failure. *Int J Cardiol.* 2013;168(4):4178-83.
47. Kelso GF, Porteous CM, Coulter CV, Hughes G, Porteous WK, Ledgerwood EC, Smith RA, Murphy MP. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. *J Biol Chem.* 2001;276:4588-96.
48. Kim Y., Phan D., van Rooij E., Wang D.Z., McAnally J., Qi X., Richardson J.A., Hill J.A., Bassel-Duby R., Olson E.N. The MEF2D transcription factor mediates stress-dependent cardiac remodeling in mice. *J. Clin. Invest.* 2008;118:124–132.10.
49. Kong HS, Tian S, Kong Y, Du G, Zhang L, Jung M, Dritschilo A, Brown ML. Preclinical studies of YK-4-272, an inhibitor of class II histone deacetylases by disruption of nucleocytoplasmic shuttling. *Pharm Res.* 2012;29(12):3373-83.
50. Kong Y, Tannous P, Lu G, Berenji K, Rothermel BA, Olson EN, Hill JA. Suppression of class I and II histone deacetylases blunts pressure-overload cardiac hypertrophy. *Circulation.* 2006;113(22):2579-88.
51. Kouzarides T. Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev.* 2002; 12:198–209.
52. Kraner SD, Chong JA, Tsay HJ, Mandel G. Silencing the type II sodium channel gene: a model for neural-specific gene regulation. *Neuron.* 1992; 9(1):37-44.

53. Kurdi M, Booz GW. Three 4-letter words of hypertension-related cardiac hypertrophy: TRPC, mTOR, and HDAC. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50(6):964-71
54. Kuroda J, Ago T, Matsushima S, Zhai P, Schneider MD, Sadoshima J. NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(35):15565-70.
55. Kuwahara K, Saito Y, Ogawa E, Takahashi N, Nakagawa Y, Naruse Y, Harada M, Hamanaka I, Izumi T, Miyamoto Y, Kishimoto I, Kawakami R, Nakanishi M, Mori N, Nakao K. The neuron-restrictive silencer element-neuron-restrictive silencer factor system regulates basal and endothelin 1-inducible atrial natriuretic peptide gene expression in ventricular myocytes. *Mol Cell Biol.* 2001;21(6):2085-97.
56. Kuwahara K, Saito Y, Takano M, Arai Y, Yasuno S, Nakagawa Y, Takahashi N, Adachi Y, Takemura G, Horie M, Miyamoto Y, Morisaki T, Kuratomi S, Noma A, Fujiwara H, Yoshimasa Y, Kinoshita H, Kawakami R, Kishimoto I, Nakanishi M, Usami S, Saito Y, Harada M, Nakao K. NRSF regulates the fetal cardiac gene program and maintains normal cardiac structure and function. *EMBO J.* 2003;22(23):6310–6321.
57. Kwon SH, Pimentel DR, Remondino A, Sawyer DB, Colucci WS. H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *J Mol Cell Cardiol.* 2003; 35: 615–621.
58. Lander HM, Haijar DP, Hempstead BL, Mirza UA, Chait BT, Campbell S and Quilliam LA. A molecular redox switch on p21 (ras). Structural basis for the nitric oxide-p21 (ras) interaction. *J. Biol. Chem.* 1997; 272(7):4323-6.
59. Lietz M, Cicchetti P, Thiel G. Inverse expression pattern of REST and synapsin I in human neuroblastoma cells. *Biol Chem.* 1998;379(10):1301-4.
60. Lowes BD, Minobe W, Abraham WT, Rizeq MN, Bohlmeyer TJ, Quaife RA, Roden RL, Dutcher DL, Robertson AD, Voelkel NF, Badesch DB, Groves BM, Gilbert EM, Bristow MR. Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest.* 1997;100(9):2315-24.
61. Lu J, McKinsey TA, Nicol RL, Olson EN. Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(8):4070-5.
62. Mallat Z, Philip I, Lebret M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A. Elevated levels of 8-isoprostaglandin F₂alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. *Circulation.* 1998; 97: 1536–1539.
63. Mann JF, Lonn EM, Yi Q, Gerstein HC, Hoogwerf BJ, Pogue J, Bosch J, Dagenais GR, Yusuf S; HOPE Investigators. Effects of vitamin E on cardiovascular outcomes in

- people with mild-to-moderate renal insufficiency: results of the HOPE study. *Kidney Int.* 2004;65(4):1375-80.
64. Marchioli R, Levantesi G, Macchia A, Marfisi RM, Nicolosi GL, Tavazzi L, Tognoni G, Valagussa F. Vitamin E increases the risk of developing heart failure after myocardial infarction: Results from the GISSI-Prevenzione trial. *J Cardiovasc Med.* 2006; 7: 347–350.
 65. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999;32(8):595-603.
 66. Matsushima S, Ide T, Yamato M, Matsusaka H, Hattori F, Ikeuchi M, Kubota T, Sunagawa K, Hasegawa Y, Kurihara T, Oikawa S, Kinugawa S, Tsutsui H. Overexpression of mitochondrial peroxiredoxin-3 prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation.* 2006;113(14):1779–86.
 67. Matsushima S, Kuroda J, Ago T, Zhai P, Ikeda Y, Oka S, Fong GH, Tian R, Sadoshima J. Broad suppression of NADPH oxidase activity exacerbates ischemia/reperfusion injury through inadvertent downregulation of hypoxia-inducible factor-1 α and upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor- α . *Circ Res.* 2013;112(8):1135-49.
 68. McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(26):14400-5.
 69. McKinsey TA. Therapeutic potential for HDAC inhibitors in the heart. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2012;52:303-19.
 70. Minucci S und Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2006; 6: 38-51.
 71. Miwa S und Brand MD. Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling. *Biochem Soc Trans.* 2003;31(Pt 6):1300-1.
 72. Mortensen SA, Kumar A, Dolliner P, Filipiak KJ, Pella D, Alehagen U, Steurer G, Littarru GP, Rosenfeldt F. The effect of coenzyme Q10 on morbidity and mortality in chronic heart failure. Results from the Q-SYMBIO study. *European Journal of Heart Failure.* 2013; 15 (S1), S20.
 73. Mosterd A und Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart.* 2007;93(9):1137-46.
 74. Murdoch CE, Zhang M, Cave AC, Shah AM. NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovasc Res.* 2006;71(2):208-15.
 75. Nakagawa Y, Kuwahara K, Harada M, Takahashi N, Yasuno S, Adachi Y, Kawakami R, Nakanishi M, Tanimoto K, Usami S, Kinoshita H, Saito Y, Nakao K. Class II HDACs

- mediate CaMK-dependent signaling to NRSF in ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;41(6):1010-22.
76. Nakao K, Minobe W, Roden R, Bristow MR, Leinwand LA. Myosin heavy chain gene expression in human heart failure. *J Clin Invest.* 1997;100(9):2362-70.
 77. Naruse Y, Aoki T, Kojima T, Mori N. Neural restrictive silencer factor recruits mSin3 and histone deacetylase complex to repress neuron-specific target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(24):13691-6.
 78. Nordberg J und Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(11):1287-312.
 79. Ogawa E, Saito Y, Kuwahara K, Harada M, Miyamoto Y, Hamanaka I, Kajiyama N, Takahashi N, Izumi T, Kawakami R, Kishimoto I, Naruse Y, Mori N, Nakao K. Fibronectin signaling stimulates BNP gene transcription by inhibiting neuron-restrictive silencer element-dependent repression. *Cardiovasc Res.* 2002;53(2):451-9.
 80. Ooi L, Wood IC. Chromatin crosstalk in development and disease: lessons from REST. *Nat Rev Genet.* 2007;8(7):544-54.
 81. Palm K, Belluardo N, Metsis M, Timmusk T. Neuronal expression of zinc finger transcription factor REST/NRSF/XBR gene. *J Neurosci.* 1998;18(4):1280-96.
 82. Papait R, Greco C, Kunderfranco P, Latronico MV, Condorelli G. Epigenetics: a new mechanism of regulation of heart failure? *Basic Res Cardiol.* 2013;108(4):361.
 83. Remondino A, Kwon SH, Communal C, Pimentel DR, Douglas B, Sawyer DB, Singh K, Colucci WS. Beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in cardiac myocytes is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent activation of the mitochondrial pathway. *Circ Res.* 2003;92(2):136-8.
 84. Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS. Role of Oxidative Stress in Myocardial Hypertrophy and Failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34, 379–388.
 85. Schoch S, Cibelli G, Thiel G. Neuron-specific gene expression of synapsin I. Major role of a negative regulatory mechanism. *J Biol Chem.* 1996;271(6):3317-23.
 86. Schoenherr CJ und Anderson DJ. The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science.* 1995;267(5202):1360-3.
 87. Schoenherr CJ, Paquette AJ, Anderson DJ. Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93: 9881–9886.
 88. Schröder E, Brennan JP, Eaton P. Cardiac peroxiredoxins undergo complex modifications during cardiac oxidant stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 295(1): H425–H433.
 89. Sheu SS, Nauduri D, Anders MW. Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1762:256-65.

90. Smith RA und Murphy MP. Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1201:96-103.
91. Smith RA, Hartley RC, Cocheme HM, Murphy MP. Mitochondrial pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33:341-52.
92. Sucharov CC, Mariner PD, Nunley KR, Long C, Leinwand L, Bristow MR. A beta1-adrenergic receptor CaM kinase II-dependent pathway mediates cardiac myocyte fetal gene induction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(3):H1299-308.
93. Sugden PH und Clerk A. Oxidative stress and growth-regulating intracellular signaling pathways in cardiac myocytes. *Antioxidants & redox signaling.* 2006;8(11-12):2111–2124.
94. Szeto HH. First-In-Class Cardioliipin Therapeutic to Restore Mitochondrial Bioenergetics. *Br J Pharmacol.* 2013.
95. Toischer K, Rokita AG, Unsöld B, Zhu W, Kararigas G, Sossalla S, Reuter SP, Becker A, Teucher N, Seidler T, Grebe C, Preuss L, Gupta SN, Schmidt K, Lehnart SE, Krüger M, Linke WA, Backs J, Regitz-Zagrosek V, Schäfer K, Field LJ, Maier LS, Hasenfuss G. Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation.* 2010;122(10):993-1003.
96. Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Hisanaga T, Maeda Y, Fukai D, Ohnishi M, Sugimoto Y, Kinoshita M. Attenuation of compensation of endogenous cardiac natriuretic peptide system in chronic heart failure: prognostic role of plasma brain natriuretic peptide concentration in patients with chronic symptomatic left ventricular dysfunction. *Circulation.* 1997;96(2):509-16.
97. Verdin E, Dequiedt F, Kasler HG. Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet.* 2003;19(5):286-93.
98. Wang X und Hayes JJ. Acetylation mimics within individual core histone tail domains indicate distinct roles in regulating the stability of higher-order chromatin structure. *Mol Cell Biol.* 2008;28:227–236.
99. Wiese S, Breyer T, Dragu A, Wakili R, Burkard T, Schmidt-Schweda S, Füchtbauer EM, Dohrmann U, Beyersdorf F, Radicke D, Holubarsch CJ. Gene expression of brain natriuretic peptide in isolated atrial and ventricular human myocardium: influence of angiotensin II and diastolic fiber length. *Circulation.* 2000;102(25):3074-9.
100. Wood ZA, Schroder E, Robin Harris J, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci.* 2003; 28 (1): 32–40.
101. Yamamoto M, Yang G, Hong C, Liu J, Holle E, Yu X, Wagner T, Vatner SF, Sadoshima J. Inhibition of endogenous thioredoxin in the heart increases oxidative stress and cardiac hypertrophy. *J Clin Invest.* 2003;112:1395–1406.

102. Zalba G, Beaumont J, San José G, Fortuño A, Fortuño MA, Díez J. Vascular oxidant stress: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol Biochem.* 2000;56(1):57-64.
103. Zhang CL, McKinsey TA, Chang S, Antos CL, Hill JA, Olson EN. Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell.* 2002;110(4):479-88.
104. Zhang M, Brewer AC, Schroder K, Santos CX, Grieve DJ, Wang M, Anikumar N, Yu B, Dong X, Walker SJ, Brandes RP, Shah AM. NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:18121-6. Zhao K, Zhao GM, Wu D, Soong Y, Birk AV, Schiller PW, Szeto HH. Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury. *J Biol Chem.* 2004;279:34682-90.

6. Publikation, Abstracts und Danksagung

Publikation

Hohl M, Wagner M, Reil JC, Müller SA, Tauchnitz M, **Zimmer AM**, Lehmann LH, Thiel G, Böhm M, Backs J, Maack C. HDAC4 controls histone methylation in response to elevated cardiac load. *J Clin Invest*. 2013;123(3):1359-70.

Abstracts

Hohl M, Müller SA, Tauchnitz M, **Zimmer AM**, Ekici M, Backs J, Thiel G, Böhm M, Maack C (2010). Histone Acetylation is Not Required for Reactivation of ANP and BNP in Human Heart Failure. *Circulation*. 122: A16189

Müller SA, Hohl M, Reil JC, Tauchnitz M, **Zimmer AM**, Backs J, Neuberger HR, Böhm M, Maack C (2010). Histone acetylation is not required for upregulation of ANF after an increase in cardiac pre- or afterload despite nuclear export of histone deacetylase 4. *Clin Res Cardiol* 99, Suppl 1

Hohl M, Reil JC, Tauchnitz M, **Zimmer AM**, Mueller SA, Lehmann LH, Kreusser MM, Backs J, Böhm M, Maack C (2011). Nuclear export of HDAC4 mediates histone demethylation at H3K9 in the promoter region of ANF in response to elevated preload. *European Heart Journal* 32 (Abstract Supplement), 663

Tauchnitz M, Hohl M, Reil JC, Müller SA, **Zimmer AM**, Lehmann LH, Kreußner MM, Böhm M, Backs J, Maack C (2011). Nuclear export of HDAC4 mediates histone demethylation at H3K9 in the promoter region of ANF in response to elevated cardiac preload. *Clin Res Cardiol* 100, Suppl 1

Wagner M, Hohl M, Tauchnitz M, **Zimmer AM**, Böhm M, Maack C (2012). Upregulation of JmjC-domain containing histone demethylases contributes to ANP and BNP gene activation in human heart failure. *Clin Res Cardiol* 101, Suppl 1