

Aus dem Bereich Innere Medizin III
Klinisch-experimentelle Medizin der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

MOLEKULARE MECHANISMEN DES KARDIALEN REMODELINGS:
VERBINDUNG ZWISCHEN EPIGENETIK UND ENERGETIK?

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2016

Vorgelegt von: Michael Wagner
geboren am 12.07.1984 in Saarbrücken-Dudweiler

Die experimentellen Arbeiten im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden in der Inneren Medizin III, Bereich kardiologische Forschung der Uniklinik Homburg durchgeführt.

Die Versuche und die Auswertung der Immunfluoreszenz wurden von Angela Mayumi Zimmer im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt.

Aufgrund der parallelen Messung der aus DLST^{+/-}-Herzen isolierten Kardiomyozyten und der Mitochondrien erfolgte die Durchführung der Atmungs- und AmplexRed-Messungen durch Nina Schnellbach, Michelle Gulentz oder Dr. Alexander Nickel. Auch die Euthanisierung aller Tiere wurde aufgrund einer fehlenden Genehmigung durch zuvor genannte Personen durchgeführt.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Veit Flockerzi
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Maack

**Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer
und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.**

(Albert Einstein)

INHALTSVERZEICHNIS

Zitat	III
Inhaltsverzeichnis.....	V
Zusammenfassung / Summary	IX
I. Einleitung	1
1. Herzinsuffizienz	1
2. Kardiales Remodeling.....	1
2.1 Strukturelle Veränderungen.....	1
2.2 Molekulare Mechanismen.....	2
3. Epigenetik der Herzinsuffizienz	3
3.1 Non-coding RNAs.....	3
3.2 DNA-Methylierung.....	3
3.3 Histone und Histonmodifikationen	4
3.4 Histonmodifizierende Enzyme	6
4. Mitochondriale Energetik und oxidativer Stress.....	8
4.1 Mitochondrien – Energielieferanten der Zelle.....	8
4.2 Citratzyklus und antioxidative Kapazität.....	9
4.3 Die α -Ketoglutarat Dehydrogenase	13
5. Zielsatzung der Arbeit	14
5.1 Rolle der Jmjd-Histondemethylasen bei der Reaktivierung des fetalen Genprogramms.....	14
5.2 α -Ketoglutarat Dehydrogenase: Verbindung zwischen Energetik und Epigenetik?	15
II. Material und Methoden.....	17
1. Materialien.....	17
1.1 Chemikalien	17
1.2 Reaktionskits.....	20
1.3 Enzyme	20
1.4 Lösungen und Puffer.....	21
1.5 Kulturmedien	26
1.6 Oligonukleotide	26
1.7 Expressionsvektoren	27
1.8 Antikörper.....	27
1.9 TaqMan Sonden	27
1.10 Eukaryotische Zelllinien.....	28
1.11 Mauslinien	28
1.12 Instrumente und Maschinen	29
2. Methoden	31
2.1 Isolation von adulten Kardiomyozyten.....	31
2.2 Isolation von neonatalen Rattenkardiomyozyten	33
2.3 Transfektion neonataler Rattenkardiomyozyten.....	34
2.4 Working Heart	35

2.5 Isolation von RNA	35
2.6 Reverse Transkription von RNA	36
2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	36
2.8 ChIP-Assay.....	37
2.9 Aufreinigung der DNA-Fragmente aus ChIP-Assay	39
2.10 Gelelektrophorese.....	39
2.11 Co-Immunopräzipitation	40
2.12 Western Blot.....	41
2.13 Immunfluoreszenzfärbung.....	42
2.14 Messungen an der IonOptix Zellverkürzungsanlage.....	43
2.15 Isolation von Mitochondrien aus Gesamtherz	46
2.16 Proteinisolierung für GSH/GSSG Messungen	46
2.17 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	47
2.18 Bestimmung von gesamt GSH und GSSG	47
2.19 Atmungsmessung.....	48
2.20 Messung von NAD(P)H und Membranpotenzial.....	48
2.21 Bestimmung von H ₂ O ₂ in isolierten Mitochondrien.....	49
2.22 Bestimmung von Enzymaktivitäten	50
2.23 Bioinformatische Arbeiten	51
2.24 Mathematische und statistische Berechnungen	51
III. Ergebnisse	52
Expressionsprofil und Histonmethylierung der NRCMs ähnelt humaner Herzinsuffizienz.....	52
JMJD1A und 2A sind redundant und kontrollieren die Expression von Anp und Bnp nur zum Teil.....	53
Kardiale Belastung führt zum Verlust der HDAC4-SUV39H1-Interaktion.....	56
Kein Einfluss von α KGDH auf H3K9-Methylierung.....	58
In DLST ^{+/-} -Herzen liegt basal vermehrt oxidiertes GSH vor verglichen mit WT Herzen.....	60
Unterschiedliche mitochondriale Atmung mit den Substraten α KG und P/M	61
NAD(P)H und $\Delta\Psi_m$ besitzen verschiedene Maxima abhängig vom Substrat	62
α KGDH ist wichtig für die Regeneration der antioxidativen Kapazität via NNT.....	65
Verminderte α KGDH-Aktivität verringert mitochondrialen O ₂ -Verbrauch und erhöht ROS-Emission	68
Redoxstatus und ROS-Produktion sind abhängig von α KGDH-Aktivität in Kardiomyozyten.....	72
IV. Diskussion	75
Jmjd-Demethylasen als Feinregulatoren.....	75
Reaktivierung fetaler Gene durch Verlust der HDAC4-SUV39H1-Interaktion	77
Jmjd-Aktivität unabhängig von α KGDH-Aktivität.....	79
α KGDH wichtiger Faktor zur Entgiftung von ROS	80
NNT ist wichtiges Bindeglied zwischen α KGDH und antioxidativer Kapazität.....	84
V. Literaturverzeichnis.....	87
VI. Anhang.....	XIII
VII. Abkürzungsverzeichnis.....	XVII
VIII. Abbildungsverzeichnis.....	XIX
IX. Tabellenverzeichnis	XXIII

X. Publikationsverzeichnis	XXIV
Danksagung	XXVII
Eidesstattliche Erklärung.....	XXIX
Lebenslauf	XXXI

ZUSAMMENFASSUNG

Molekulare Mechanismen des kardialen Remodelings: Verbindung zwischen Epigenetik und Energetik?

In der vorliegenden Arbeit sollten zum einen die Rolle von Histonmodifikationen und Histonmodifizierenden Enzymen bei der Reaktivierung des fetalen Genprogramms während der Ausbildung der Herzinsuffizienz untersucht werden. Zum anderen sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen Energetik und Epigenetik an Hand der α -Ketoglutarat Dehydrogenase (α KGDH), welche einen wichtigen Cofaktor (α -Ketoglutarat) für die JmjdC-containing Histondemethylasen liefert, untersucht werden. Ferner sollte die Bedeutung dieses Enzyms für die Entwicklung von oxidativem Stress erforscht werden. Durch vorausgegangene Versuche sowohl an humanem Herzgewebe, als auch im Mausmodell des „Working Heart“ konnte gezeigt werden, dass es in insuffizienten Herzen bzw. nach erhöhter hämodynamischer Druckbelastung im Mausherz zu einem nukleären Export der Histondeacetylase 4 (HDAC4) kommt. Dies führte zur Demethylierung von H3K9 und zu einem Bindungsverlust von HP1 – beides repressive Markierungen – im Promotorbereich der beiden Markergene *ANP* und *BNP*, was in einer erhöhten Expression dieser Gene resultierte. Für die Demethylierung von H3K9 wurde mittels primärer und stabiler Zellkultur ein Modell entwickelt, bei dem die Histonmethyltransferase SUV39H1 durch HDAC4 an die entsprechenden Promotoren rekrutiert wird und diese durch Methylierung von H3K9 in einem inaktiven Zustand hält. Durch den Export von HDAC4 kommt es zur Dissoziation dieses repressiven Komplexes, so dass nun keine aktive Methylierung mehr stattfindet und gleichzeitig die beiden Histondemethylasen JMJD1A und JMJD2A an H3K9 angreifen und den repressiven Zustand aufheben können. Da eine erhöhte Expression von JMJD1A und JMJD2A nur in insuffizienten Herzen, nicht aber im Mausmodell nachgewiesen werden konnte, lag eine Vermutung darin, dass es durch eine Blockierung des Citratzyklusenzym α KGDH zur Akkumulation seines Substrates α -Ketoglutarat (α KG) kommt, welches seinerseits Cofaktor für die JMJD-Demethylasen ist und möglicherweise deren Aktivität erhöht. In einem Mausmodell mit Tieren, die eine heterozygote Deletion der zweiten Untereinheit dieses Enzyms besitzen (DLST Mäuse) konnte allerdings ein direkter Einfluss der α KGDH auf die Histonmethylierung und die Expression fetaler Gene im Modell des Working Hearts nicht bewiesen werden. Allerdings zeigte sich – sowohl in Versuchen an isolierten Mitochondrien von C57BL/6 Mäusen und DLST Mäusen, als auch in isolierten Zellen von DLST Mäusen – dass dieses Enzym eine essenzielle Rolle bei der Entgiftung der mitochondrialen Sauerstoffradikale besitzt. Dabei wird das von der α KGDH gebildete NADH fast ausschließlich zur Regeneration von NADPH, einem wichtigen Cofaktor für Enzyme der

antioxidativen Kapazität, verwendet. Dieser Vorgang ist scheinbar direkt mit dem Vorhandensein einer funktionalen, in der inneren mitochondrialen Membran verankerten Nicotinamid Nukleotid Transhydrogenase (NNT) verbunden, welche die Umsetzung von NADH und NADP⁺ zu NADPH und NAD⁺ katalysiert und damit eine essenzielle Rolle bei der Entgiftung von ROS und der Progression der Herzinsuffizienz besitzt.

SUMMARY

Molecular mechanisms of cardiac remodeling: link from energetics to epigenetics?

The main topics of this thesis were on one hand to investigate the role of histone modifications and histone modifying enzymes in reactivation of the fetal gene program during progression of heart failure and on the other hand to elucidate a possible connection between epigenetics and cellular energy demand in form of the enzyme α -ketoglutarate dehydrogenase (α KGDH) which provides an important cofactor (α -ketoglutarate) to the Jmjc-containing histonedemethylases. In addition, this enzyme's contribution to generating or diminishing oxidative stress should be analyzed. In previous studies from human tissue and in a mouse model of working heart, we showed stable nuclear export of the histone deacetylase 4 (HDAC4) in failing hearts or after elevated hemodynamic workload in mouse hearts. This led to demethylation of H3K9 as well as loss of HP1 binding – both repressive marks – in the promoter region of the marker genes *ANP* and *BNP* resulting in increased expression of these genes. The mechanism of demethylation was investigated in primary and stable cell culture and I propose a mechanism that involves recruitment of the histone Methyltransferase SUV39H1 at distinct promoter regions by complexing with HDAC4 and HP1 to highly methylate H3K9 resulting in a repressive state of the respect gene. HDAC4 export then leads to dissociation of the repressive complex, so H3K9 methylation is abolished and H3K9 demethylation can be performed by histone demethylases JMJD1A and JMJD2A. Due to the fact that these enzymes are upregulated in failing hearts but not in the working heart model I investigated a possible mechanism where JMJD activity is increased by their cofactor α -ketoglutarate which may accumulate due to a block of the Kreb's cycle enzyme α KGDH. I observed no correlation between α KGDH activity and histone demethylation as well as *Anp/Bnp* reactivation in a working heart model with mice that have a heterozygous deletion of the second subunit of α KGDH (DLST mice). However, experiments on isolated heart mitochondria of C57BL/6 mice and DLST mice as well as experiments on isolated cardiac myocytes of DLST mice showed that α KGDH is an essential enzyme in detoxification of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) by regulating antioxidative capacity. I think that the

α KGDH derived NADH mainly regenerates NADPH – an important cofactor for the enzymes of the antioxidativen capacity – instead of fueling the respiratory chain to support energy demand. In addition, this seems to be directly connected to the presence of functional nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) which is located in the inner mitochondrial membrane catalyzing the reaction of NADH and NADP^+ to NADPH and NAD^+ and therefore playing an essential role in eliminating ROS and preventing progression of heart failure.

I. EINLEITUNG

1. Herzinsuffizienz

Laut den Leitlinien der ESC (European Society of Cardiology) von 2012 definiert sich die Herzinsuffizienz als „Anomalie der Herzstruktur oder -funktion, die dazu führt, dass das Herz nicht mehr in der Lage ist eine angemessene Menge Sauerstoff an die entsprechenden Gewebe zu liefern“ [57]. Patienten zeigen dabei oft typische Symptome wie Atemnot oder Müdigkeit, die allerdings relativ unspezifisch sind, so dass die Diagnose durch weitere Parameter ergänzt werden muss [57].

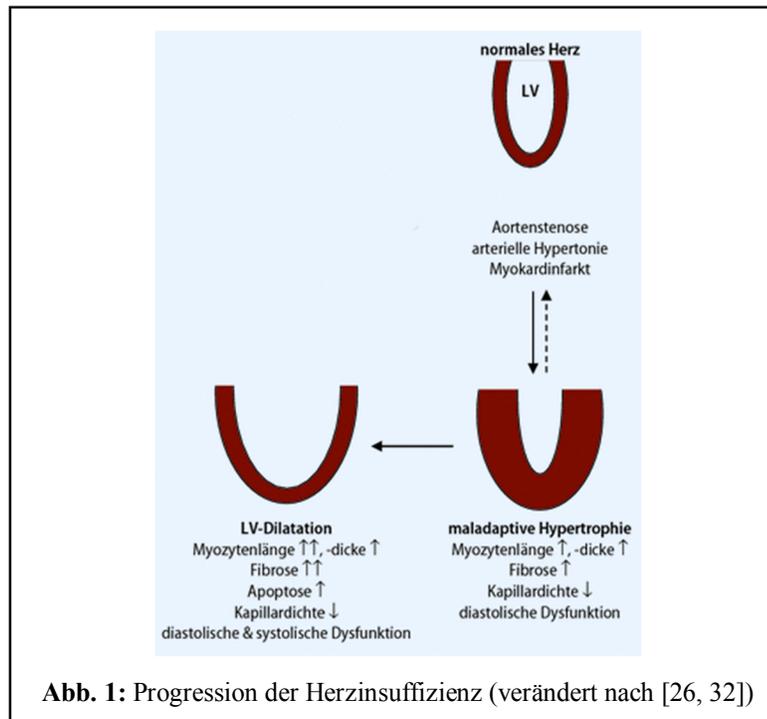
Die Inzidenz einer Herzinsuffizienz bei Erwachsenen liegt in Industrieländern bei etwa 1 – 2 % mit einer Prävalenz von mehr als 10 % bei Menschen über 70 Jahren. Je nach Ursache und Ausprägung des jeweiligen Krankheitsbildes muss eine entsprechende Therapie eingeleitet werden bis hin zu operativen Eingriffen [57].

Bei über 75 % der Patienten ist die Herzinsuffizienz eine direkte Folge einer – unter Umständen schon seit Jahren bestehenden – arteriellen Hypertonie, welche zu Hypertrophie und letztendlich Dilatation des linken Ventrikels führt [33]. Die damit einhergehenden Umbauprozesse sollen nachfolgend näher erläutert werden.

2. Kardiales Remodeling

2.1 Strukturelle Veränderungen

Wie oben erwähnt kommt es durch eine dauerhafte Druckbelastung des Herzens (mechanisch oder neurohumoral) zunächst zu einer Verdickung des linken Ventrikels und des Septums (Hypertrophie). In dieser Phase vergrößern sich die Durchmesser der einzelnen Kardiomyozyten durch die Einlagerung weiterer Sarkomere parallel zu den bereits vorhandenen Einheiten. Des Weiteren kann bereits jetzt eine beginnende interstitielle Fibrose beobachtet werden [87]. Hält die Belastung an, gehen die Myozyten auf Grund zellulärer Signale von einem „Breitenwachstum“ in ein „Längenwachstum“ über, welches durch den Einbau von Sarkomeren in Serie gekennzeichnet ist. Begleitet wird dieser Prozess von einem vermehrt auftretenden Zellverlust durch Apoptose und Nekrose sowie einer fortschreitenden Fibrose, was letztendlich zur Dilatation des linken Ventrikels und somit zur Herzinsuffizienz führt [32, 88] (s. auch Abb. 1).



2.2 Molekulare Mechanismen

Die intrazellulären Signalwege, die den oben genannten Umbauprozessen zu Grunde liegen sind äußerst komplex, beeinflussen sich z.T. gegenseitig und sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Dennoch konnte bereits recht früh von mehreren Gruppen in humanem Gewebe eine Erhöhung der Genexpression des natriuretischen Peptides ANP nachgewiesen werden, welches auch mit der klinische Schwere der Krankheit korreliert [20, 74]. Weitere Untersuchungen zeigten im Laufe der Zeit, dass es bei der Ausprägung der Herzinsuffizienz zu der sogenannten Reaktivierung des fetalen Genprogramms als prohypertrophe Antwort kommt, bei dem neben ANP auch das zweite natriuretische Peptid BNP reexprimiert wird [37]. Als weitere Indikatoren einer sich entwickelnden Herzinsuffizienz wurden der Übergang der schweren Myosinketten von der schnellen alpha- (mehr Kraftentwicklung) in die langsamere beta-Form (weniger Kraftentwicklung) und eine erniedrigte Expression der sarkoplasmatischen Retikulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) identifiziert [1, 60, 61]. Sowohl bei der Reaktivierung fetaler Gene, als auch bei anderen molekularen Veränderungen während der Ausprägung der Herzinsuffizienz scheinen epigenetische Prozesse maßgeblich beteiligt zu sein, welche in Abschnitt 3 näher zusammengefasst sind. Da es sich beim Herzen um einen permanent arbeitenden Muskel handelt, kommt neben den (epi)genetischen Prozessen auch dem Energiehaushalt und der damit eng verbundenen Regulierung von mitochondrialem oxidativen Stress eine wichtige Rolle zu. Ein Überblick dazu ist in Abschnitt 4 zusammengefasst.

3. Epigenetik der Herzinsuffizienz

Die Epigenetik beschäftigt sich ursprünglich mit erblichen Veränderungen der Regulation der Genexpression, die allerdings nicht auf die Veränderung der DNA-Sequenz zurückzuführen sind (Epi = über, neben;[89]). Zu den Hauptmechanismen der epigenetischen Genregulation gehören die immer größer werdende Gruppe von regulatorischen, nichtkodierenden RNAs [25], die sequenzspezifische DNA-Methylierung [30] und die Bindung und Organisation von Nukleosomen sowie deren Veränderung an einzelnen Histonen [71].

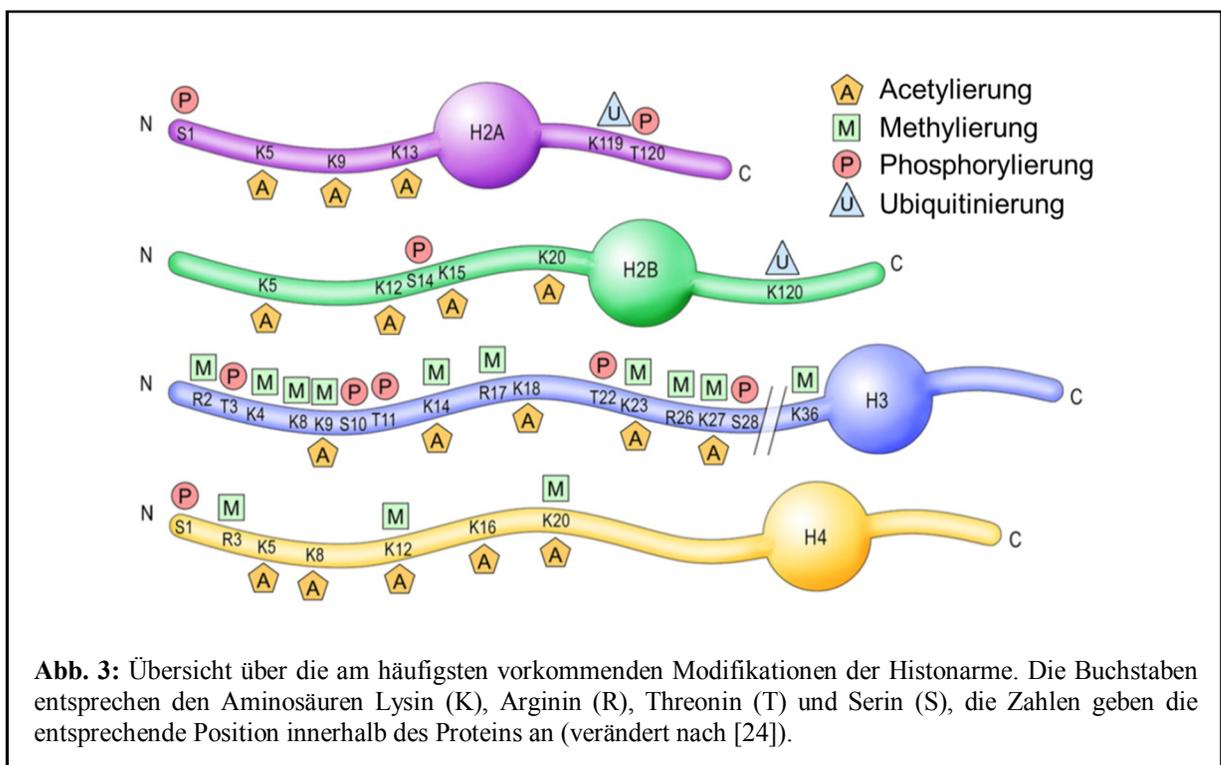
3.1 Non-coding RNAs

Der Ursprung dieser Art der Genregulation liegt in Versuchen an Pflanzen und dem Fadenwurm *C. elegans*, bei denen durch Einführung einer künstlichen doppelsträngigen RNA gezielt ein Gen bzw. dessen Ausprägung ausgeschaltet werden konnte und dies auch an die Nachkommen vererbt wurde [22, 63]. Im weiteren Verlauf wurde festgestellt, dass in *C. elegans* solche kleinen RNAs auch endogen, also im zelleigenen Genom selbst codiert sind und dass diese jetzt MicroRNAs (miRNAs) genannten Moleküle auch in höheren Organismen vorkommen [42, 44]. So überrascht es nicht, dass sie auch bei der Entstehung der Herzinsuffizienz beteiligt sind. Als Beispiel sei hier miRNA-199b angeführt, deren Expression in kranken Herzen erhöht ist. Inhibierung dieser miRNA im Tiermodell führte zur Protektion der Tiere für die Ausbildung einer Hypertrophie und konnte diese sogar rückgängig machen [13]. Neuere Untersuchungen identifizierten eine weitere Klasse regulatorischer RNAs: long non-coding RNAs (lncRNAs), welche ebenso wie die miRNAs bei der Entwicklungen einer kardialen Hypertrophie beteiligt sein können [86]. Aufgrund der hohen Target-Variabilität v.a. der miRNAs (eine miRNA hat viele Zielgene) muss sich ihre therapeutische Funktionalität allerdings noch bestätigen.

3.2 DNA-Methylierung

Die Methylierung der DNA erfolgt fast ausschließlich an Cytosinresten, die sich in der Sequenzabfolge 5'-CpG-3' befinden. Diese CpGs verteilen sich dabei relativ inhomogen über das Genom und kommen in sog. CpG-Inseln gehäuft vor. CpG-Inseln wiederum befinden sich meistens in Promotornähe von Genen, so dass der Methylierungsgrad der DNA (hohe Methylierung = inaktives Gen, niedrige Methylierung = aktives Gen) über die Expression des entsprechenden Gens entscheidet [58, 77]. Bei der Ausbildung der Herzinsuffizienz scheint aber weniger die DNA-Methylierung an sich, als die Interaktion mit Methylierung erkennenden Enzymen wie

Erste Analysen der Nukleosomen *in vitro* zeigten, dass sie durch die Packung der DNA in Chromatin sowohl die Initiierung, als auch die Elongation der Transkription verhindern und somit die Expression von Genen beeinflussen [29, 36]. Da es *in vivo* nicht immer sinnvoll ist, durch die Bindung von Nukleosomen ein Gen ständig in einem inaktiven Zustand zu halten, gibt es mehrere Möglichkeiten, wie die DNA zugänglich gemacht wird. Ein wichtiger Angriffspunkt, um die mit Nukleosomen besetzte DNA für Proteine und Enzyme zugänglich zu machen sind Modifikationen der Histone. Die basischen Aminosäuren in den Armen sind Ankerpunkte für diverse Modifikationen, wobei die wichtigsten Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung sind (Abb. 3).

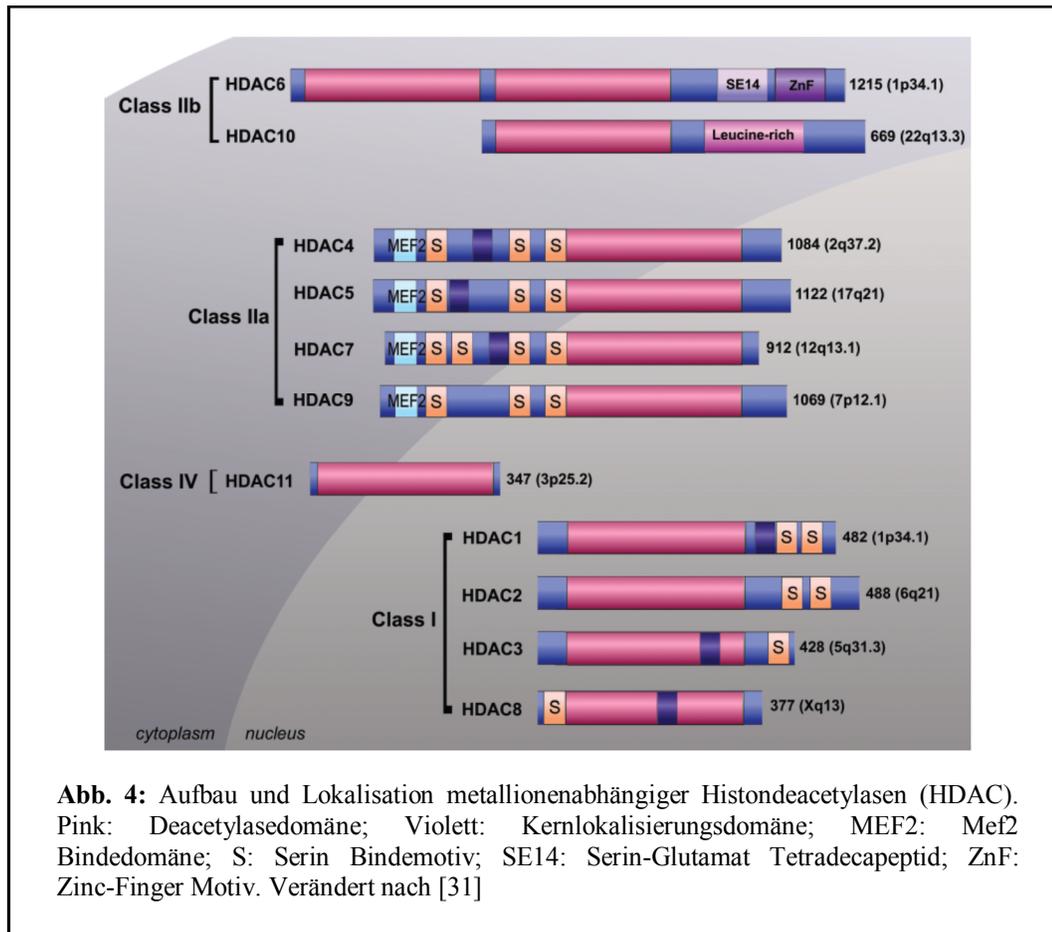


Je nach Art der Modifikation kommt es dabei entweder zur Lockerung (Euchromatin = aktive Gene) oder einer Verdichtung (Heterochromatin = inaktive Gene) des Chromatins. Während Phosphorylierung und Ubiquitinierung eher Einfluss auf strukturelle Eigenschaften der Nukleosomen selbst haben, stehen die beiden anderen Modifikation in direktem Zusammenhang mit der Expression von Genen. So führt eine Acetylierung der Histone i. A. zur Entwindung der DNA von den Nukleosomen, so dass diese für Transkriptionsfaktoren und RNA Polymerase besser zugänglich ist und das entsprechende Gen abgelesen werden kann [23, 43]. Im Falle der Histonmethylierung bestimmt die Anzahl und Position der entsprechenden Modifikation, ob ein positiver oder negativer Einfluss auf ein zugehöriges Gen ausgeübt wird. Eine genomweite Kartierung ergab dabei, dass z.B. die Monomethylierung von Histon 3 an den Lysinresten 9 und 27

(kurz: H3K9 bzw. H3K27) sowie die Methylierung von H3K4 mit aktiven Genen verbunden ist, wohingegen eine Di- oder Trimethylierung von H3K9 und H3K27 in Bereichen mit inaktiven Genen gefunden wurde [9]. Des Weiteren bildet die Trimethylierung an H3K9 eine Modifikation, die von dem Repressorprotein Heterochromatin Protein 1 (HP1) erkannt wird, so dass durch dessen Bindung der heterochromatische Zustand weiter gefestigt wird [8]. Die Enzyme, welche das Anbringen der Modifikationen katalysieren, werden entsprechend ihrer Funktion als Histonacetyltransferasen (Acetylierung) bzw. -deacetylasen (Deacetylierung) und Histonmethyltransferasen (Methylierung) und -demethylasen (Demethylierung) bezeichnet.

3.4 Histonmodifizierende Enzyme

Histonacetyltransferasen (HATs) wurden ursprünglich als Coaktivatoren bei der transkriptionellen Genregulation identifiziert. Erst später wurde klar, dass diese Aktivierung durch eine intrinsische Acetylierungsaktivität bedingt ist [51]. Entsprechendes gilt auch für die **Histondeacetylasen** (HDACs), welche aufgrund ihrer Deacetylierungsaktivität zunächst als Corepressoren identifiziert wurden. Aufgrund ihres strukturellen Aufbaus, ihrer Funktionsweise und z. T. ihrer Lokalisation können HDACs in mehrere Familien aufgeteilt werden: Klasse I, Klasse II und Klasse IV HDACs (Metallionen als Cofaktor; Abb. 4) und Klasse III HDACs (Sirtuine; NAD⁺ abhängig) [31].



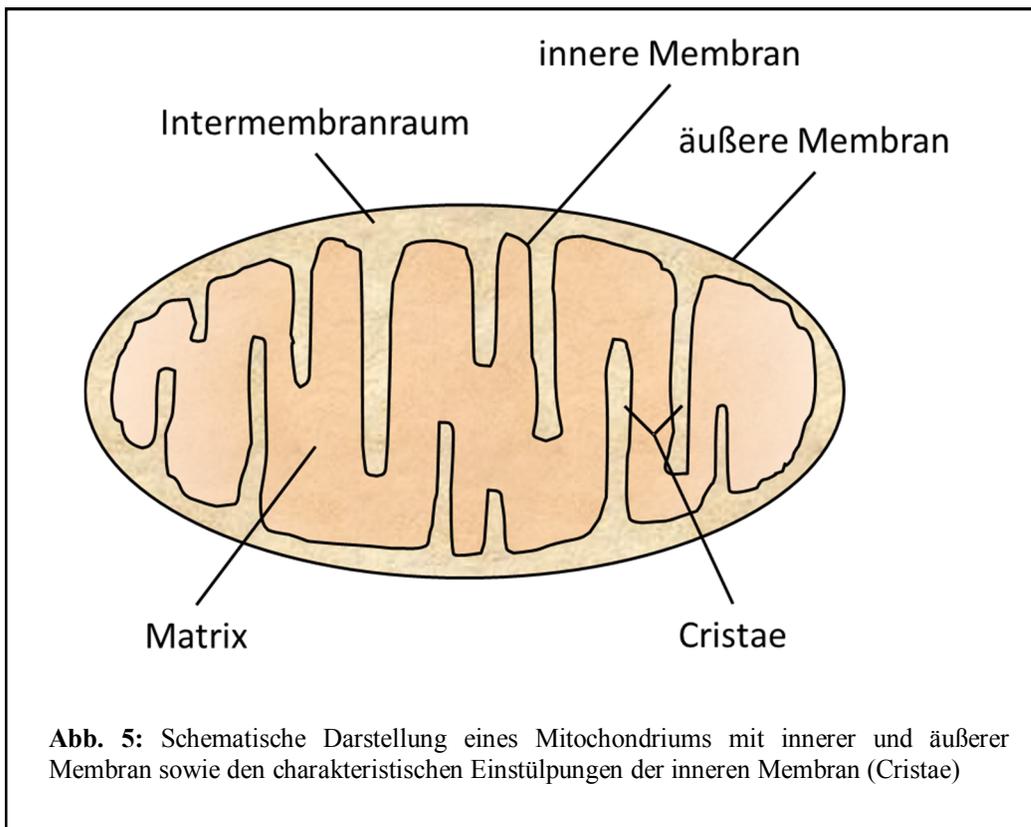
Interessanterweise besitzen alle Klasse IIa HDACs eine Bindedomäne für den Transkriptionsfaktor Myocyte Enhancing Factor 2 (Mef2), wodurch ihnen eine spezielle Rolle in Kardiomyozyten zukommt (s. Abschnitt 5).

Wie in Abbildung 3 zu sehen ist, tritt – im Gegensatz zur Acetylierung – die Histonmethylierung nicht nur an Lysinresten, sondern auch Argininresten auf. Zusätzlich können diese Reste mono-, di- (Arginin) und trimethyliert (Lysin) vorliegen (s.o.). Bis ins Jahr 2004 wurde die Methylierung von Histonen als irreversible Modifikation angesehen, doch durch die Entdeckung der H3K4 spezifischen Histondemethylase LSD1 (Lysine specific demethylase 1) wurde klar, dass auch die Histonmethylierung ein dynamischer Prozess ist [75]. Etwa zwei Jahre später wurde dann die erste Histondemethylase der Gruppe der JmjC (Jumonji C) domain-containing demethylases (kurz Jmjd) beschrieben [83]. Weitere Demethylasen folgten, die aufgrund ihrer relativ hohen Spezifität für einen bestimmten Lysinrest entsprechend als Aktivatoren (z.B. Demethylierung von H3K9) oder Repressoren (z.B. Demethylierung von H3K4) fungieren (vgl. Abbildung 3). Auf die H3K9 spezifischen Histonmethyltransferase Suv39H1 und -demethylasen Jmjd1 und 2 wird im Abschnitt 5 näher eingegangen. Die meisten der histonmodifizierenden Enzyme sind abhängig von Cofaktoren, unter anderem auch von Zwischen- oder Nebenprodukten des Citratzyklus [34, 62], welcher innerhalb der Mitochondrien der Zellen abläuft.

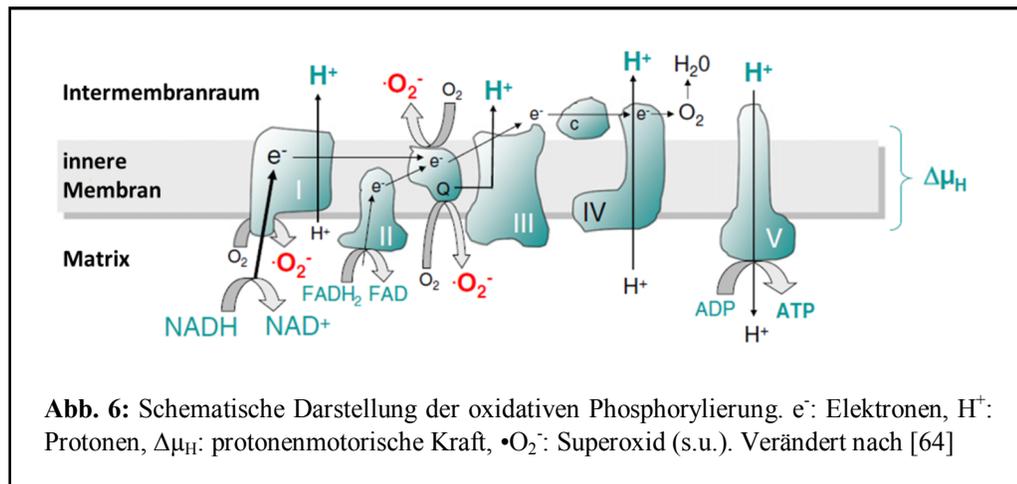
4. Mitochondriale Energetik und oxidativer Stress

4.1 Mitochondrien – Energielieferanten der Zelle

Die Mitochondrien sind Zellorganellen, die von einer doppelten Zellmembran umgeben sind und in elektronenmikroskopischen Aufnahmen meistens eine runde bis ovale Form zeigen. Der mitochondriale Innenraum wird als Matrix bezeichnet und ist durch lamellenartige Einstülpungen, den Cristae, durchsetzt (Abb. 5) [68].



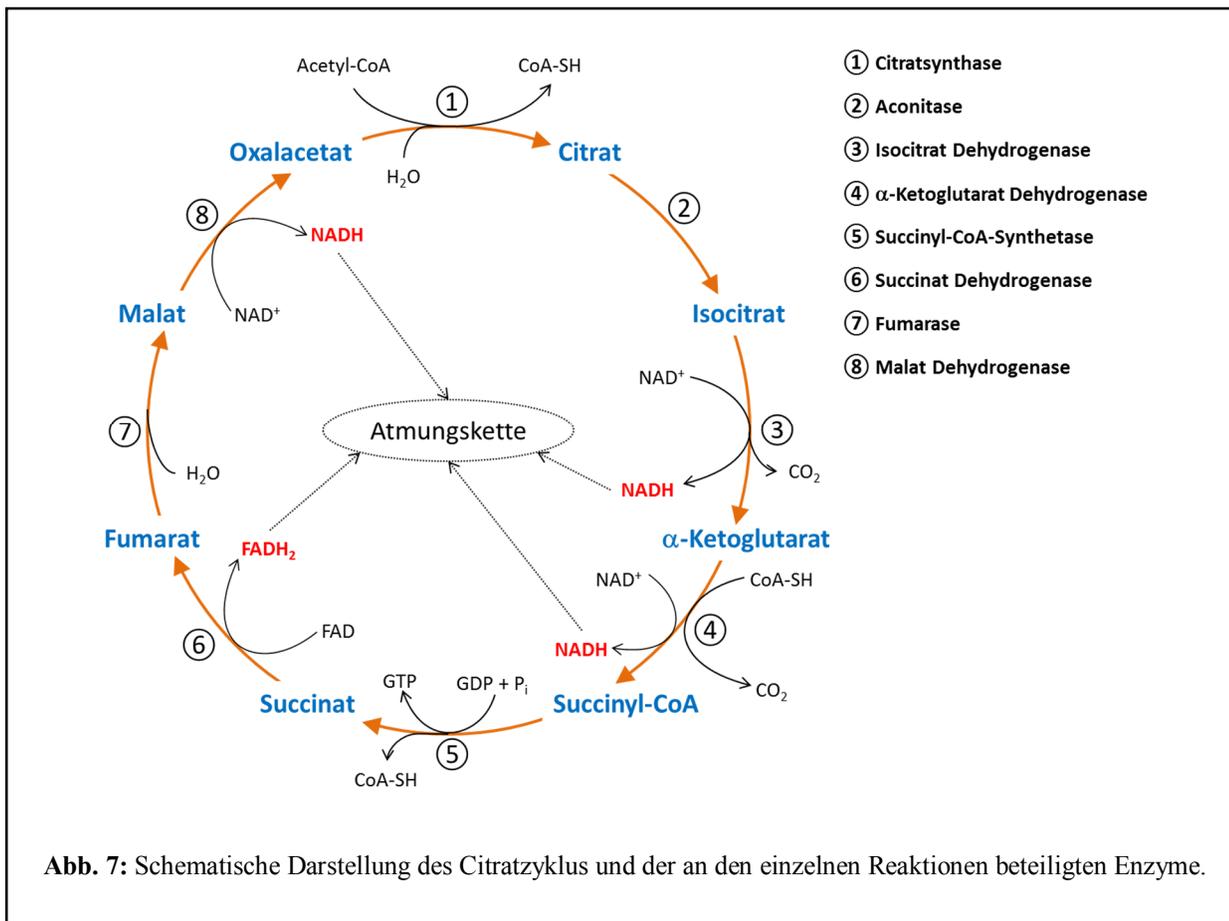
Eine Hauptaufgabe der Mitochondrien ist die Gewinnung von Energie aus der Oxidation von Redoxäquivalenten (NADH, FADH₂), die Elektronen an die sog. Atmungskette – ein Multienzymkomplex in der inneren mitochondrialen Membran – abgeben können. Über einen mehrstufigen Prozess werden die Elektronen über die einzelnen Komplexe der Atmungskette letztendlich auf Sauerstoff unter Bildung von Wasser übertragen (mitochondriale Atmung). Die durch diesen Vorgang frei werdende Energie dient dem Export von Protonen in den Intermembranraum, so dass eine protonenmotorische Kraft entsteht, die letztlich zur Umwandlung von ADP in ATP durch die F₁F₀-ATPase genutzt wird (= oxidative Phosphorylierung; Abb. 6) [64].



Die für die mitochondriale Atmung und damit die Energiegewinnung der Zelle benötigten Redoxäquivalente NADH und $FADH_2$ stammen dabei überwiegend aus dem Citratzyklus.

4.2 Citratzyklus und antioxidative Kapazität

Die Entdeckung des Citratzyklus geht auf den deutschen Wissenschaftler Hans Adolf Krebs zurück, der 1937 Citrat als zentralen Stoff während des metabolischen Abbaus identifizierte und für seine Aufklärung 1953 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde [40]. Ausgangspunkt ist die Kombination von Oxalacetat und dem aus diversen Abbaureaktionen stammende Acetylrest Acetyl-CoA zum Citrat. Diese wird in mehreren Reaktionen wieder zu Oxalacetat unter Abspaltung von CO_2 umgewandelt und der Kreislauf kann von vorne beginnen (Abb. 7).

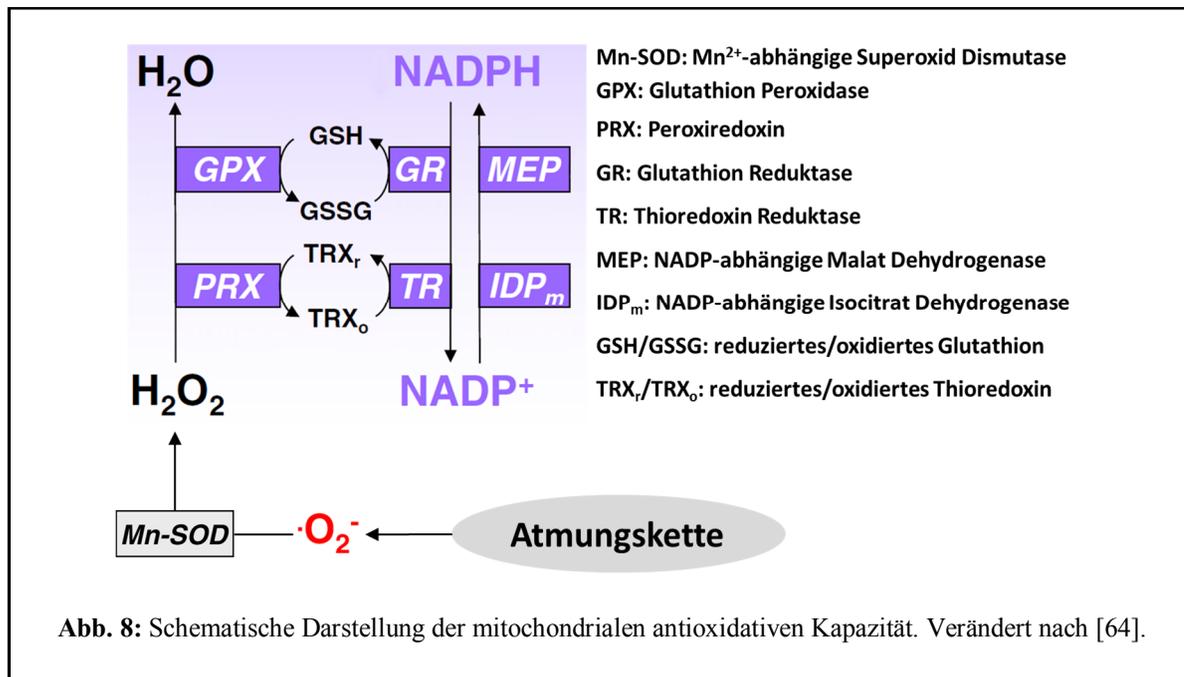


Wie bereits in Abbildung 6 gezeigt, gibt es innerhalb der Atmungskette für die Elektronen die Möglichkeit diese an Komplex I und III frühzeitig zu verlassen und irregulär auf Sauerstoff unter Bildung des Superoxid Radikals ($\bullet\text{O}_2^-$) überzuspringen. Dies geschieht v.a. dann, wenn sich die Atmungskette in einem hoch reduziertem Zustand befindet, also bei hoher Elektronendichte innerhalb der Atmungskette und gleichzeitig hoher Protonendichte im Intermembranraum auf Grund fehlender ADP-Umsetzung (sog. State 4 Atmung) [39]. Dies bedeutet gleichzeitig, dass der Citratzyklus durch die Lieferung von NADH und FADH_2 an die Atmungskette an der Entstehung von ROS indirekt beteiligt ist. Somit ist eine Regulierung des Fluxes zwingend erforderlich und u.a. von Ca^{2+} abhängig (s.u.), als auch an die Entstehung von ROS gekoppelt. So führt oxidativer Stress z.B. zu einer relativ schnellen, aber auch reversiblen Inaktivierung der Aconitase [11].

Das an der Atmungskette entstehende Superoxidradikal ist Ausgangspunkt zur Bildung weiterer ROS wie H_2O_2 oder des Hydroxylradikals ($\bullet\text{OH}$), welche auf Grund ihrer hohen Reaktivität Schäden in diversen Makromolekülen verursachen können [76]. Dementsprechend kommt nicht nur der Regulation der Entstehung von ROS, sondern auch deren Entgiftung – der sog. antioxidativen Kapazität – bereits direkt im Mitochondrium eine wichtige Rolle zu.

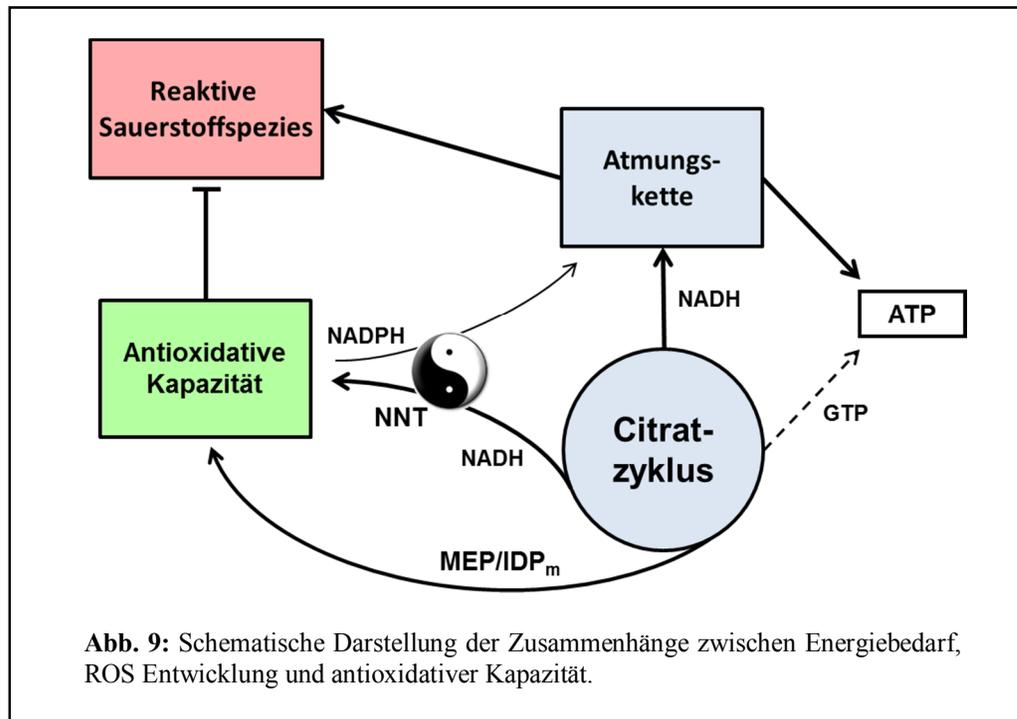
Das an der Atmungskette gebildete Superoxid wird dabei durch die manganabhängige Superoxid Dismutase zunächst zu H_2O_2 umgewandelt. Dieses wiederum wird innerhalb der Mitochondrien

durch die Enzyme Peroxiredoxin und Glutathion Peroxidase durch die Oxidation von Thioredoxin und Glutathion zu Wasser weiterverarbeitet. Die Regeneration von oxidiertem Glutathion und Thioredoxin erfolgt dann über die NADPH-abhängigen Enzyme Thioredoxin Reduktase und Glutathion Reduktase, wobei das dafür benötigte NADPH wiederum durch Enzyme des Citratzyklus regeneriert wird (Abb. 8) [3, 91].



Neben den beiden NADP-abhängigen Enzymen aus dem Citratzyklus sorgt noch ein weiteres Enzym für die Regeneration von NADPH: die Nicotinamid Nukleotid Transhydrogenase, kurz Nnt. Dieses Enzym ist in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert und katalysiert die Reaktion von NADH – ebenfalls aus dem Citratzyklus stammend – und NADP^+ zu NADPH und NAD^+ unter Verbrauch der protonenmotorischen Kraft [72]. Eine Deletion der Exone 6 – 12 und damit dem Funktionsverlust dieses Enzyms wurde in dem Mausstamm C57BL/6J nachgewiesen und führte zunächst zu einer verminderten Glukosetoleranz [81]. Da die Nnt grundsätzlich für die Regeneration der antioxidativen Kapazität verantwortlich ist, würde man in dieser Mauslinie unter pathologischem Stress einen erhöhten oxidativen Stress erwarten. Entgegen dieser Hypothese konnten wir in einer früheren Studie zeigen, dass in dieser Situation – also bei pathologisch erhöhter Nachlast des Herzens – die Nnt den hohen Energieverbrauch an der Atmungskette zu kompensieren versucht und von einem Vorwärtsmodus in einen Rückwärtsmodus wechselt. Dieser reverse Modus der Nnt hat zur Folge, dass das für die antioxidative Kapazität wichtige NADPH wieder unter Bildung von NADH – welches dann zur ATP Produktion an der Atmungskette zur Verfügung steht – verbraucht wird und somit nicht mehr zur Eliminierung der ROS bereitsteht. In den C57BL/6J-Mäusen ohne funktionell aktive Nnt bleibt das NADPH unangetastet und somit die antioxidative Kapazität

erhalten [65]. Dies zeigt zum einen, dass die Modulation von NADH und NADPH Redoxstatus elementar für die Bildung und Entgiftung von ROS ist und zum anderen, dass der Citratzyklus und seine Interaktion mit der Nnt ein wichtiger Mediator zwischen dem Bedarf an Energie einerseits und der Regeneration der antioxidativen Kapazität andererseits darstellt (Abb. 9).



Wie bereits oben erwähnt steht oxidativer Stress in direktem Zusammenhang mit der Funktion des Herzens als permanent arbeitendem Muskel. Entsprechend konnte die Arbeitsgruppe um Belch nachweisen, dass bei Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz deutlich mehr Lipidperoxide als Maß für oxidativen Stress besitzen, als gesunde Kontrollpatienten und dass die Höhe des oxidativen Stress direkt mit der Schwere der Krankheit verbunden ist [10]. Auf molekularer Ebene kommt es dabei durch ROS nicht nur zur Schädigung der mitochondrialen DNA und damit letztendlich zum Funktionsverlust des Mitochondriums [28, 79]; auch die elektromechanische Kopplung der Kardiomyozyten und damit die Kontraktionsfähigkeit des Herzens wird durch eine fehlregulierte Ca^{2+} -Homöostase gestört [85]. Entsprechend zeigte sich in mehreren Tiermodellen, dass eine herabgesetzte Fähigkeit zur Entgiftung von ROS zu einer Verschlechterung des kardialen Phänotypen führt, eine Verbesserung der antioxidativen Kapazität hingegen die Ausprägung einer Herzinsuffizienz abschwächen kann [15, 52].

Da wie bereits erwähnt mehrere wichtige Faktoren der antioxidativen Kapazität aus dem Citratzyklus stammen spielt dieser eine zentrale Rolle bei der Entstehung und Bekämpfung von ROS. Ein Schlüsselenzym des Citratzyklus ist die α -Ketoglutarat Dehydrogenase, die – wie in Abbildung 7 gezeigt – die Reaktion von α -Ketoglutarat (α KG) zu Succinyl-CoA unter Bildung von NADH katalysiert.

4.3 Die α -Ketoglutarat Dehydrogenase

Das Enzym α -Ketoglutarat Dehydrogenase (α KGDH) ist ein Multienzymkomplex bestehend aus mehreren Kopien der drei Untereinheiten α -Ketoglutarat Dehydrogenase (OGDH), Dihydrolipoyl Succinyltransferase (DLST) und Dihydrolipoyl Dehydrogenase [80]. Da der Schritt von α KG zu Succinyl-CoA als irreversibel gilt, kommt der α KGDH eine entscheidende Rolle bei der Regulierung des Flux durch den Citratzyklus zu [12]. Entsprechend ist ihre Aktivität unter anderem vom Verhältnis von ADP zu ATP abhängig. So führen hohe ADP-Konzentrationen (hoher Energiebedarf) zu einer Aktivierung, hohe ATP-Konzentrationen (niedriger Energiebedarf) hingegen zu einer Inaktivierung des Enzyms [67, 78]. Auch Ca^{2+} – welches auch weitere Enzyme des Citratzyklus positiv beeinflusst – führt zu einer erhöhten Aktivität dieses Enzyms [16, 54]. Da zu einem Zeitpunkt mit hohen ATP-Konzentrationen („state 2“ Atmung) die Wahrscheinlichkeit zur Entstehung von ROS an der Atmungskette erhöht ist (s. Abschnitt 4.2) ist die α KGDH zusätzlich auch sensitiv gegenüber oxidativem Stress und wird durch H_2O_2 reversibel in ihrer Aktivität gehemmt. Der dabei zu Grunde liegende Mechanismus ist allerdings indirekter Natur und auf die reversible Glutathionylierung des Enzyms zurückzuführen, die neben einer Inaktivierung auch die Funktionalität des Enzyms sicherstellt [4, 56, 66]. Somit ist die α KGDH nicht nur Modulator des Citratzyklus, sondern greift auch indirekt in die Regulation der ROS-Produktion ein.

5. Zielsetzung der Arbeit

5.1 Rolle der Jmjd-Histondemethylasen bei der Reaktivierung des fetalen Genprogramms

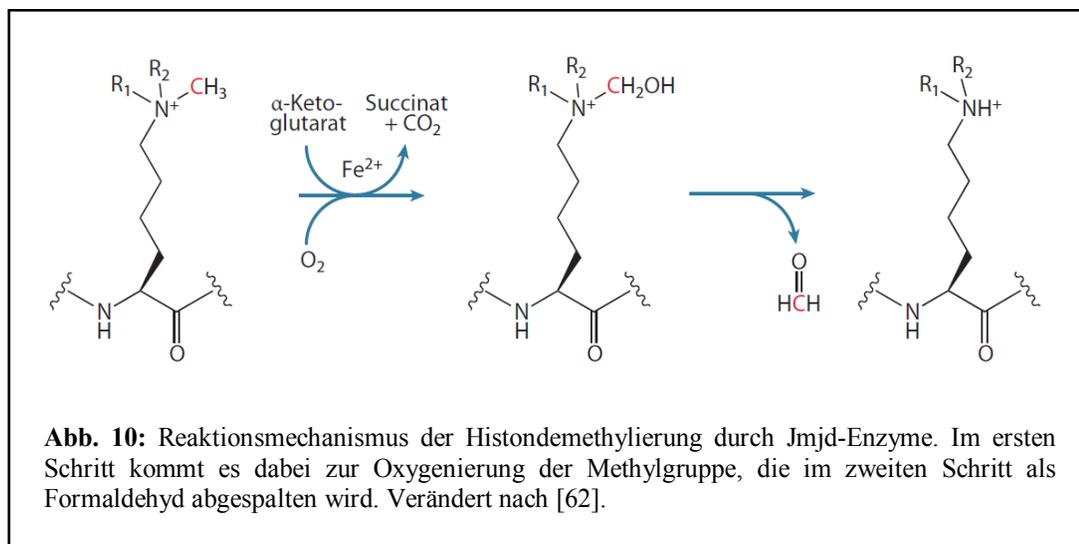
Wie bereits unter 2.2 beschrieben kommt es während der Entwicklung einer Herzinsuffizienz zur Reaktivierung des fetalen Genprogramms. In diesem Zusammenhang ist durchaus die Beteiligung von epigenetischen Prozessen denkbar. Wie in Abbildung 4 gezeigt besitzen die Klasse IIa HDACs eine Bindestelle für MEF2 und reprimieren durch ihre Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor spezifisch dessen Zielgene [59]. Diese sind unter anderem wichtig für die Differenzierung von Kardiomyozyten, aber auch an prohypertrophen Signalwegen beteiligt. Sowohl HDAC4, als auch die anderen Klasse IIa HDACs sind sensitiv für die Phosphorylierung durch die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII), wodurch es zur Dissoziation der HDACs von MEF2 und deren Export aus dem Zellkern kommt, so dass MEF2-abhängige Gene transkribiert werden können und es zur kardialen Hypertrophie kommt [7, 48, 55, 92]. In ersten Versuchen an menschlichem Gewebe verglichen wir Herzen von insuffizienten Patienten, die eine Transplantation erhielten, mit gesunden Spenderherzen und untersuchten, ob sich auch hier ein nukleärer HDAC4-Export manifestiert und ob dies zu Veränderungen der Histonmodifikationen führt. Als Zielgene dienten dabei die beiden natriuretischen Peptide ANP und BNP, welche in der Diagnostik als wichtige Marker für Herzinsuffizienz fungieren. Dabei stellten wir zunächst folgende Gegebenheiten fest:

- Wie erwartet war die Expression der beiden natriuretischen Peptide in den insuffizienten Herzen deutlich erhöht, wohingegen die Gene αMHC und SERCA herabreguliert waren (vgl. Abschnitt 2.2)
- In den insuffizienten Herzen kam es zu einem massiven nukleären HDAC4-Export, welcher positiv mit der Reaktivierung von ANP und BNP korrelierte
- Überraschenderweise kam es dagegen nur unwesentlich zu einer Erhöhung der Acetylierung der Promotorregionen von ANP und BNP. Stattdessen konnten wir eine Demethylierung von H3K27, aber v.a. von H3K9 im Promotorbereich feststellen.
- Diese Erniedrigung der Promotormethylierung korrelierte dabei ebenfalls positiv mit der Reaktivierung von ANP und BNP und zog einen Verlust der Bindung von HP1 im Promotorbereich unserer Markergene nach sich [27]

Durch weitere Untersuchungen konnten wir zeigen, dass es sich bei den dafür verantwortlichen Enzymen möglicherweise um die Demethylasen Jmjd1 und Jmjd2 handelt, da die Expression dieser Enzyme in den insuffizienten Herzen erhöht war. Ziel dieser Arbeit war es, die Beteiligung der Histondemethylasen Jmjd1 und Jmjd2 an der Demethylierung des Promotorbereichs von ANP und BNP im Modellsystem der neonatalen Rattenkardiomyozyten zu beweisen. Des Weiteren sollte eine mögliche Rolle der Interaktion von HDAC4 mit der Histonmethyltransferase Suv39H1, welche spezifisch H3K9 methyliert und so die Plattform für die Bindung von HP1 bildet, gezeigt werden.

5.2 α -Ketoglutarat Dehydrogenase: Verbindung zwischen Energetik und Epigenetik?

In weiteren Untersuchungen der Rolle von Histonmodifizierung bei der Ausprägung der Herzinsuffizienz kam die Methode des Working Heart Systems zum Einsatz, bei dem Mausherzen einem definierten Stress in Form einer erhöhten Vor- oder Nachlast ausgesetzt wurden, um so die hämodynamischen Verhältnisse bei einer Herzinsuffizienz zu simulieren. Auch in diesem Falle kam es zu einem massiven Export von HDAC4 aus dem Nukleus, einer signifikanten Aktivierung von ANP und BNP sowie zu einer signifikanten Demethylierung von H3K9 und dem Verlust von HP1 im Promotorbereich der beiden Gene. Diese Veränderungen konnten dabei bereits nach 30 Minuten erhöhter Vor- oder Nachlast festgestellt werden [27]. Im Gegensatz zu den Daten im menschlichen Gewebe kam es hier aber nicht zu einer erhöhten Expression der beiden Demethylasen Jmjd1 und Jmjd2, so dass für diese frühe Antwort ein anderer Mechanismus verantwortlich sein könnte. Die Reaktion der Histondemethylierung ist im Falle der Jmjd-Enzyme unter anderem von den Cofaktoren Eisen und dem Citratzyklus-Intermediär α KG abhängig (Abb. 10).



Aus diesem Grund ist es denkbar, dass sich durch die Erhöhung der Vor- oder Nachlast eine Aktivitätsänderung der α KGDH ergibt, so dass sich α KG ansammelt und dies wiederum die Aktivität der Jmjd-Demethylasen steigert wodurch es zu der beobachteten Demethylierung kommt.

Des Weiteren wurde von mehreren Gruppen in den letzten Jahren eine Rolle der α KGDH bei der Bildung von ROS suggeriert. So zeigten Tretter und Kollegen an aus Schweineherzen isolierten Enzymen, dass bei einer hohen Konzentration von NADH und dem Fehlen sonstiger Substrate die α KGDH durchaus eine bedeutende Menge ROS produziert. Sind die restlichen Cofaktoren allerdings anwesend, geht die Entstehung von ROS vollständig zurück [82]. Die Gruppe um Quinlan *et al.* hingegen konnte einen nicht unerheblichen Beitrag der α KGDH bei der Produktion von ROS in isolierten Skelettmuskelmitochondrien zeigen, denen als Substrat nur α KG zur Verfügung standen. Allerdings wurde in allen entsprechenden Versuchen der Komplex I Blocker Rotenon benutzt, welcher seinerseits die Bildung von ROS an Komplex I forciert, so dass die gemessene Menge an H_2O_2 in diesem Fall auch von dieser Quelle stammen könnte [69]. Tatsächlich hat unsere Gruppe – wie unter Abschnitt 4.2 beschrieben – gezeigt, dass die Fähigkeit des Citratzyklus zur Regeneration von NADPH und der antioxidativen Kapazität einen Hauptfaktor darstellt, um mitochondriale ROS-Produktion zu minimieren.

Dementsprechend sollte nicht nur die Rolle der α KGDH bei der Demethylierung der Histone untersucht werden, sondern auch ihre Funktion bei der Entstehung und Eliminierung von mitochondrialem oxidativem Stress. Hierzu wurden Mäuse mit einer heterozygoten Deletion der zweiten Untereinheit der α KGDH verwendet und mit ihren WT Geschwistern unter verschiedenen Stressprotokollen verglichen. Des Weiteren wurde die Rolle der α KGDH für mitochondrialen oxidativen Stress an Hand von Versuchen mit dem selektiven α KGDH-Inhibitor KMV (s. Material und Methoden) in C57BL/6N und C57BL/6J Mitochondrien untersucht.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Materialien

1.1 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (30%)	Bio-Rad GmbH, München, Deutschland
ADP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Agarose (SeaKem [®] LE Agarose)	Lonza Rockland Inc., Rockland, USA
α -Ketoglutarat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg, Deutschland
Amplex UltraRed	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
ANTI-FLAG [®] M2 Affinity Gel	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
ATP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
BDM (2,3-Butandionmonozim)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Calciumchlorid (Lösung)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Calciumchlorid (Feststoff)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Citrat	Calbiochem, San Diego, USA
Complete mini Proteaseinhibitor	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
Cyanid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Cystein	Merck, Darmstadt, Deutschland
DAPI	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
DCF (2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetat)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Dikaliumhydrogenphosphat	VWR, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DNCB (2,4-Dinitrochlorbenzol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DNP (2,4-Dinitrophenol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

DTNB (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Doppelt deionisiertes Wasser (ddH ₂ O)	Braun AG, Melsungen, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
EGTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	VWR, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
FCCP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
(Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazine)	
FCS	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Formaldehyd (36,5%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glukose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glycerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glycin	VWR, Darmstadt, Deutschland
Glutathion reduziert (GSH)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glutathion oxidiert (GSSG)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Goat Serum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Heparin-Natrium	Braun AG, Melsungen, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Horse Serum (HS)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Igepal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Isocitrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Isofluran	Abbott GmbH & Co. KG, Ludwigshafen, Deutschland
Isoprenalin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ketavet (Wirkstoff: Ketamin)	Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland
KMV (3-Methyl-2-Oxovalerat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

L aminin	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
Lithiumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
M 2VP (1-Methyl-2-vinylpyridin Triflat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Malat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Mannitol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methanol	VWR, Darmstadt, Deutschland
NAD ⁺	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NADP ⁺	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	VWR, Darmstadt, Deutschland
Neonatal Calf Serum (NCS)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
O ligomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
P enicillin/Streptomycin (P/S)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Phenolrot	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Pipes	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Protein A/G Agarose	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Pyruvat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
R imadyl (Wirkstoff: Carprofen)	Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland
Rompun (Wirkstoff: Xylazin)	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Rotenon	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
S accharose	Merck, Darmstadt, Deutschland
T aurin	Merck, Darmstadt, Deutschland
TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
T MRM (Tetramethylrhodaminmethylester)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

Tris-Base	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt, Deutschland

1.2 Reaktionskits

High Pure RNA Isolation Kit	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
peqGold TriFast	VWR, Darmstadt, Deutschland
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
peqLab TaqPol all inclusive	VWR, Darmstadt, Deutschland
TaqMan Master Mix	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
KAPA™ SYBR® Fast ABI Prism®	VWR, Darmstadt, Deutschland
QIAquick PCR purification kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Amersham ECL Detection Reagent	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
BioRad DC™ Protein Assay	Bio-Rad GmbH, München, Deutschland

1.3 Enzyme

Collagenase Typ II	Worthington, Lakewood, USA
DNase I (peqLab)	VWR Life Science, Erlangen, Deutschland
Glutathionreduktase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Horse Radish Peroxidase (HRP)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Liberase TH	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
Pankreatin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Proteinase (bakterial; 7 – 14 U/mg)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Proteinase K (20 mg/ml)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
RNAse H (2 U/μl)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Superoxiddismutase (SOD)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

1.4 Lösungen und Puffer

ADS-Puffer:	116 mM NaCl 20 mM HEPES 0,8 mM Na ₂ HPO ₄ 5,6 mM Glukose 5,4 mM KCl 0,8 mM MgSO ₄ pH auf 7,35 einstellen, steril filtrieren
AfCS Stock (10x):	1,13 M NaCl 47 mM KCl 6 mM KH ₂ PO ₄ 6 mM Na ₂ HPO ₄ 12 mM MgSO ₄ 120 mM NaHCO ₃ 100 mM KHCO ₃ 100 mM HEPES 0,32 mM Phenolrot
AfCS Spüllösung (250 ml):	25 ml AfCS Stock (10x) 10 mM BDM 30 mM Taurin 5,5 mM Glukose ddH ₂ O ad 250 ml pH auf 7,46 einstellen
AfCS Verdaulösung:	20 ml AfCS Spüllösung 200 µl Liberase TH (7,2 mg/ml) 40 µl Trypsin (70 mg/ml) 12,5 mM CaCl ₂
Stopp 1 Lösung:	9 ml AfCS Spüllösung 1 ml FCS 12,5 mM CaCl ₂

Stopp 2 Lösung:	28,5 ml AfCS Spüllösung 1,5 ml FCS 12,5 mM CaCl ₂
Normaltyrode Stock (10x):	1,3 M NaCl 50 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 100 mM HEPES
Normaltyrode (NT):	100 ml Normaltyrode Stock (10x) 2 mM Pyruvat 0,3 mM Ascorbinsäure 10 mM Glukose 1 mM CaCl ₂ ddH ₂ O ad 1000 ml pH auf 7,54 einstellen
Tyrode Working Heart:	2,5 mM CaCl ₂ 116 mM NaCl 4,5 mM KCl 25 mM NaHCO ₃ 1,3 mM NaH ₂ PO ₄ 5,6 mM Glukose 1,6 mM MgSO ₄ Direkt nach Herstellung mit O ₂ begasen
Atmungspuffer (AP):	137 mM KCl 2,5 mM MgCl ₂ 2 mM KH ₂ PO ₄ 0,5 mM EGTA 20 mM HEPES pH 7,2 mit KOH oder HCl

Isolationspuffer (IS):	225 mM Mannitol 75 mM Saccharose 2 mM HEPES 1 mM EGTA pH 7,4 mit Tris-Base oder Tris-HCl
Mitochondrien Suspensionspuffer (MSS):	225 mM Mannitol 75 mM Saccharose 2 mM HEPES pH 7,4 mit Tris-Base oder Tris-HCl
GSH-Puffer:	106,1 mM K_2HPO_4 18,7 mM KH_2PO_4 6,3 mM EDTA
ChIP Buffer:	0,01 % SDS 1,1 % Triton X-100 1,2 mM EDTA 16,7 mM TRIS pH 8,1 167 mM NaCl
Low Salt Buffer:	0,1 % SDS 1 % Triton X-100 2 mM EDTA 20 mM TRIS pH 8,1 150 mM NaCl
High Salt Buffer:	0,1 % SDS 1 % Triton X-100 2 mM EDTA 20 mM TRIS pH 8,1 500 mM NaCl

Li Wash Buffer:	0,25 M LiCl 1 % Igepal 1 mM EDTA 10 mM TRIS pH 8,0
TE-Puffer (10x)	100 mM Tris-Cl (pH 8,0) 10 mM EDTA (pH 8,0)
Elutionspuffer (ChIP):	1 % SDS 0,1 M NaHCO ₃
PBS (10x):	1,37 M NaCl 27 mM KCl 20 mM KH ₂ PO ₄ 100 mM Na ₂ HPO ₄
TBS (10x):	500 mM TRIS-Base 1,5 M NaCl
TBS-T (1x):	1 ml Tween 20 100 ml 10 x TBS ddH ₂ O ad 1000 ml
Puffer IP-A:	150 mM NaCl 50 mM TRIS-HCl 1 mM EDTA 1 % Triton X-100 1 mM PMSF pH auf 7,4 einstellen, sterilfiltrieren ½ Complete mini Tablette pro 10 ml Puffer

Puffer IP-B:	500 mM NaCl 50 mM TRIS-HCl 1 mM EDTA 1 % Triton X 1 mM PMSF pH auf 7,4 einstellen, steril filtrieren ½ Complete mini Tablette pro 10 ml Puffer
Puffer IP-Wash:	50 mM TRIS-HCl (pH 8,0) Steril filtrieren
Puffer Resin Wash:	0,1 M Glycin pH auf 3,5 einstellen, steril filtrieren
Lämmli-Puffer (2x):	4 % SDS 20 % Glycerin 120 mM TRIS-HCl pH 6,8 0,02 % Bromphenolblau
TAE-Puffer (50x):	2 M TRIS-HCl 250 mM Natriumacetat 500 mM EDTA pH auf 7,8 einstellen
Elektrophorese-Puffer (SDS-PAGE):	25 mM TRIS-HCl 0,1 % SDS 200 mM Glycin pH auf 8,2 – 8,4 einstellen
Transfer-Puffer:	25 mM TRIS-HCl 192 mM Glycin 20 % Methanol

1.5 Kulturmedien

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Medium 199	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
F10 Medium	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

1.6 Oligonukleotide

Alle im Folgenden aufgelisteten Primer für PCR-Reaktion wurden von der Firma mwg (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland), die verwendeten siRNAs von der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) bezogen (Tab. 1 und 2).

Tab. 1: Verwendete Oligonukleotide für die ChIP Assays aus neonatalen und adulten Rattenkardiomyozyten mit entsprechender Annealing Temperatur T_M

Primer	Sequenz	T_M [°C]
rat_ANPprom_For	5'-ACAAGCTTCGCTGGACTGAT-3'	60
rat_ANPprom_Rev	5'-GCTGTCTCGGCTCACTCTCT-3'	60
rat_BNPprom_For	5'-GAGCAGGAAACAAGGACCTG-3'	60
rat_BNPprom_Rev	5'-GGGTGGGGTTATCTCTGAT-3'	60

Tab. 2: Auflistung der verwendeten siRNAs für knock-down Experimente in NRCM. Als Kontrolle wurden entsprechende scrambled siRNAs verwendet.

Zielgen	siRNA-ID/Sequenz (Sense)	Bemerkung
Jmjd1a	Rn_Jmjd1a_3	5'-Cy3-Label
Jmjd2a	Rn_LOC313539_1	5'-Cy3-Label
Jmjd1a scrambled	5'-CUCACCGAUUACCGUACUATT-3'	-
Jmjd2a scrambled	5'-GCUCGAAACGCCUUAAGAATT-3'	-

1.7 Expressionsvektoren

Die für die CoIP- und Immunfluoreszenzversuche verwendeten Expressionsvektoren für die einzelnen Proteine wurden von der Abteilung Molekulare Kardiologie und Epigenetik (AG Prof. Dr. Johannes Backs) der Universitätsklinik Heidelberg zur Verfügung gestellt

1.7 Antikörper

Alle verwendeten Antikörper sind in nachfolgender Tabelle 3 aufgeführt.

Tab. 3: Auflistung der verwendeten Antikörper sowie Zuordnung zu der entsprechenden Methode

Antigen	AK-Nummer	Firma	Methode
H3K9 Dimethylierung	ab1220	Abcam, Cambridge, UK	ChIP
H3K9 Trimethylierung	ab8898	Abcam, Cambridge, UK	ChIP
Natürliches IgG	sc-2025	Santa-Cruz, Heidelberg, Deutschland	ChIP
Myc-Tag	sc-789	Santa-Cruz, Heidelberg, Deutschland	CoIP
FLAG-Tag-HRP	A8592	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	CoIP
FLAG-Tag	F7425	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	Immunfluoreszenz
Rabbit IgG (Sekundärantikörper)	VEC-TI-1000	Biozol, Eching, Deutschland	Immunfluoreszenz

1.8 TaqMan Sonden

Alle verwendeten Sonden zur Durchführung der Realtime-PCR wurden von Applied Biosystems (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) bezogen und sind in nachfolgender Tabelle 4 aufgelistet.

Tab. 4: Verwendete TaqMan-Sonden zur Analyse der Genexpression

Gen	Probe-Nummer
Nppa (ANP)	Rn00561661_m1
Nppb (BNP)	Rn00676450_g1
Jmjd1a	Rn00598469_m1
Jmjd2a	Rn01417083_m1
Atp2a2 (Serca)	Rn00568762_m1
Fhl1	Rn01402101_m1
Gapdh	Rn99999916_s1

1.9 Eukaryotische Zelllinien

Hek293T-Zellen:

Bei dieser seit dem Ende der 1970er Jahre bestehenden Zelllinie handelt es sich um adhären wachsende, embryonale Nierenzellen (**H**uman **E**mbyonic **K**idney). Der Zusatz T steht für eine spezielle Form dieser Zellen, die zusätzlich das große T-Antigen des SV40 Virus exprimieren, so dass ein verbessertes Wachstum und eine größere Adhärenz erreicht wurden. Sie wurden von der Abteilung Genetik/Epigenetik (AG Prof. Dr. Jörn Walter) der Universität des Saarlandes zur Verfügung gestellt.

Cos1-Zellen:

Bei dieser stabilen Zelllinie handelt es sich um adhären wachsende, fibroblastenähnliche Nierenzellen der grünen Meerkatze. Auch diese Zelllinie besitzt das große T-Antigen des SV40 Virus; sie wurde von der Abteilung Molekulare Kardiologie und Epigenetik (AG Prof. Dr. Johannes Backs) der Universitätsklinik Heidelberg zur Verfügung gestellt.

1.10 Mauslinien

C57BL/6N- und C57BL/6J-Mäuse wurden von der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) erworben. DLST^{+/-}-Mäuse und WT Geschwisterpaare wurden von Lexicon Pharmaceuticals im Auftrag von Prof. Dr. Gary E. Gibson hergestellt [90] und mit freundlicher Genehmigung durch Prof. Dr. Stéphane Heymans und Dr. Ward Heggermont (Zentrum für molekulare und vaskuläre Biologie der KU Leuven) an unser Labor weitergegeben. Sowohl WT als auch DLST^{+/-}-Mäuse zeigen keinen basalen Phänotypen, DLST^{-/-}-Mäuse hingegen sind embryonal letal. Alle Mäuse

wurden in den entsprechenden Räumlichkeiten des Zentrum für molekulare und vaskuläre Biologie der KU Leuven gezüchtet und genotypisiert und zum Tierstall der Klinisch-Experimentellen Chirurgie (Leiter: Prof. Dr. Michael Menger) versandt. Alle Versuchstiere wurden im Tierstall der Klinisch-Experimentellen Chirurgie entsprechend den dort vorgegebenen Richtlinien in einem 12h/12h Tag/Nacht-Rhythmus gehalten bei freiem Zugang zu Futter und Wasser.

1.11 Instrumente und Maschinen

Zentrifugen:

Galaxy 16HD	VWR, Darmstadt, Deutschland
Heraeus Fresco 21	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Heraeus Megafuge 1.0/1.0R	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Heraeus Biofuge pico	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

Mikroskope:

Eclipse Ti-S (IonOptix-Anlage)	}	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Eclipse E600		
Alphaphot-2 YS2		
SUZ 645 Binokular mit		
Schott KL1500 LCD Licht		Schott AG, Mainz, Deutschland

Wasserbäder:

GFL 1086	GFL mbH, Burgwedel, Deutschland
Haake DC10-B3	Thermo Electron GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ecoline Staredition E 100	Lauda GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland

Sonstiges:

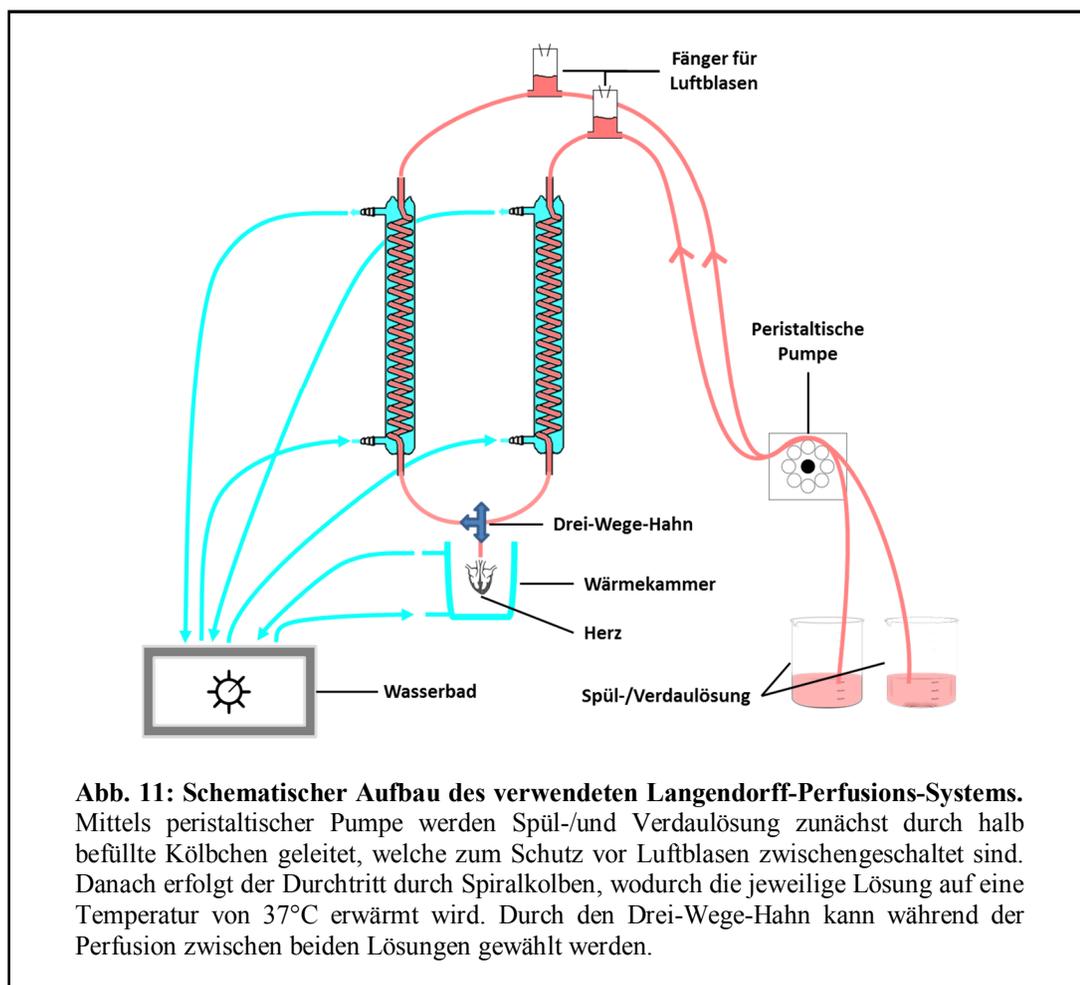
Pipetten	VWR, Darmstadt, Deutschland
	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Präparierbesteck	FST GmbH, Heidelberg, Deutschland

GeneGenius bio imaging System	Syngene Europe, Cambridge, UK
Curix 60 Entwicklermaschine	Agfa HealthCare NV, Mortsel, Belgien
Photometer DU [®] 730	Beckman Coulter GmbH, Krefeld Deutschland
CO ₂ -Inkubator Heraeus Heracell 150	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA WTC
Binder Inkubator	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Zellkultur-Sterilbank Safe 2020	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Kern ABS Feinwaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
peqLab advanced primus 96 PCR-Maschine	VWR, Darmstadt, Deutschland
Applied StepOne Plus (Realtime)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Nanodrop 2000	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Infinite M200 pro Plattenreader	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Fluovac Isofluran-System	Harvard Apparatus, Holliston, USA
Branson Sonifier 250	Branson Ultrasonics, Danbury, USA
VWR Tube Rotator (Überkopfschüttler)	VWR, Darmstadt, Deutschland
pH-Meter CyberScan pH510	Eutech Instruments, Landsmeer, Niederlande
Oxygraph Clark-Elektrode	Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, UK
Ismatec REGLO digital MS-4/8 Schlauchpumpe	Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland
Unterdruckpumpe	Schwarzer Precision GmbH & Co. KG, Essen, Deutschland
Heizung TC-324B (Zellkammer)	Warner Instruments, Hamden, USA
Heizung (Zufluss)	SI Heidelberg, Heidelberg, Deutschland

2. Methoden

2.1 Isolation von adulten Kardiomyozyten

Zur Isolation von adulten Kardiomyozyten wurde ein Langendorff-Perfusions-System verwendet, bei dem über einen Drei-Wege-Hahn zwischen Spül- und Verdaulösung umgeschaltet werden kann. Dabei werden beide Lösungen durch das Gegenstromprinzip auf eine Temperatur von 37°C erwärmt bevor sie das Herz erreichen. Der prinzipielle Aufbau der Anlage ist in nachfolgender Abbildung 11 vereinfacht dargestellt:



Das jeweilige Herz wird dabei retrograd durch die Aorta mit der entsprechenden Lösung durchspült. Als Richtlinie diente das Protokoll der AfCS (T. O'Connell, Y. Ni: Isolation of Adult Mouse Cardiac Myocytes from One Heart; AfCS Procedure Protocol PP00000125 Version 1 [11/05/02]), welches an die jeweilige Tierart angepasst wurde.

Aus Mäusen:

Vor der eigentlichen Isolation erfolgte zunächst die subkutane Applikation von 250 I.E. Heparin zur Verhinderung der Koagulation sowie 5 mg/kg Carprofen zur Schmerzlinderung. Nach etwa 10 min. wurden die Mäuse mittels Inhalationsnarkose (Isofluran; Fluss: 5% Isofluran mit 0,5 ml/min) betäubt und mittels Zwischenzehenreflex die Narkosetiefe überprüft. Nach dem Ausbleiben des Reflexes und damit bei einer ausreichend tiefen Narkose wurde der Brustkorb vom Bauchraum aufwärts eröffnet und das Herz freigelegt. Danach erfolgte die Entfernung des Herzens, welches in eine P6 Schale mit Spüllösung zur Freipräparierung der Aorta überführt wurde. Im Anschluss wurde die Aorta in einer weiteren P6 Schale kanüliert, mittels Ethicon Mersilene 5-0 Präparierfaden (Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) fixiert und in die vorbereitete Langendorff-Anlage eingesetzt. Das Herz wurde zunächst 4 min. mit Spüllösung und anschließend zwischen 4 und 8 min. mit Verdaulösung bei einer Flussrate von 1,75 ml/min perfundiert (die Verdauzeit wurde je nach Linie, Geschlecht und Verdauerfolg [s.u.] angepasst). Das verdaute Herz wurde dann unterhalb der Vorhöfe mittels Feinschere von der Kanüle entfernt und in einer P6 Schale mit Spüllösung aufgefangen. Dort erfolgte mittels vier Schnitten die sternförmige Öffnung des Herzens, welches dann in eine weitere P6 Schale bestehend aus 5 ml Spüllösung und 5 ml „Stopp 1“ zum Abstoppen des Verdaus überführt wird. Hier erfolgt ein 4 minütiges Schwenken um die Kardiomyozyten in Lösung zu bringen. Das verdaute Herz wurde danach verworfen und die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon überführt (zur Kontrolle des Verdaus wurde ein Tropfen Suspension lichtmikroskopisch beurteilt und die Verdauzeit ggf. angepasst). Die Zellen wurden 8 min. bei RT sedimentiert (erstes Pellet), der Überstand wurde danach in ein frisches 15 ml Falcon überführt und 1 min. bei 800 g und RT zentrifugiert (zweites Pellet). Dieser Überstand wurde verworfen, beide Pellets wurden in je 5 ml „Stopp 2“ aufgenommen und in einer P10 Schale vereinigt. Hier erfolgte der Ca²⁺-Aufbau durch sukzessive Zugabe von CaCl₂ im Abstand von jeweils 4 min. zum Erreichen folgender Ca²⁺-Konzentrationen: 50 µl 10 mM CaCl₂ (= 62 µM Endkonzentration) → 50 µl 10 mM CaCl₂ (112 µM Endkonzentration) → 100 µl 10 mM CaCl₂ (212 µM Endkonzentration) → 30 µl 100 mM CaCl₂ (500 µM Endkonzentration) → 50 µl 100 mM CaCl₂ (1 mM Endkonzentration). Danach wurde die Zellsuspension erneut in ein 15 ml Falcon überführt und 8 min. bei RT sedimentiert. Der Überstand wurde in ein frisches 15 ml Falcon überführt, 1 min. bei 800 g zentrifugiert und der entsprechende Überstand verworfen. Beide Pellets wurden danach in Medium M199 (+ 5% FCS, + 1% P/S, + 1% HEPES) aufgenommen, in einer P10 Schale vereinigt und unter Standardbedingungen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Aus Ratten:

Die Behandlung der Ratten, die Betäubung (Flussrate: 5% Isofluran mit 0,5 ml/min) und die Präparation des Herzens erfolgten entsprechend dem Vorgehen bei Mäusen. Zur Fixierung wurde hier der Ethicon Ethibond Excel 4-0 Präparierfaden (ebenfalls Johnson & Johnson) benutzt. Nach dem Einbringen des Herzens in die Langendorff-Anlage wurde dieses zunächst 4 min. mit Spüllösung und danach 5 min. mit Verdauösung bei einer Flussrate von 8 ml/min perfundiert. Das verdaute Herz wurde unterhalb der Vorhöfe abgeschnitten, in einer P10 Schale mit Spüllösung aufgefangen und mittels Feinschere zerkleinert. Zur Entfernung des Restgewebes wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon filtriert und danach 1 min bei 800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 x PBS (+ Complete mini Tablette) gewaschen und anschließend in einer adäquaten Menge 1 x PBS aufgenommen oder bei -80°C gelagert.

Beide Isolationen wurden auf Grund der schwierigen technischen Handhabung im Wesentlichen von Michelle Gulentz und Nina Schnellbach durchgeführt.

2.2 Isolation von neonatalen Rattenkardiomyozyten

Die primäre Zellkultur der neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRCM) dient als etabliertes Modellsystem zur Untersuchung der molekularen Prozesse während der Ausbildung der kardialen Hypertrophie.

3 – 5 Tage alte Sprague-Dawley Ratten wurden mittels großer Schere dekapitiert und der Brustkorb mittels kleiner Schere senkrecht zur ersten Schnittfläche bis maximal zum Zwerchfell geöffnet um Kontaminationen des Magen-Darm-Traktes zu vermeiden. Durch leichten Druck auf den Unterkörper wurde das jeweilige Herz freigelegt, abgeschnitten und in einer P10 Schale mit ADS-Puffer auf Eis gesammelt. Danach wurden die Vorhöfe und sonstiges Gewebe mittels Feinschere abgetrennt und die Ventrikel in eine frische P10 Schale mit ADS-Puffer überführt. Hier erfolgte die Dissektion der Ventrikel mittels Cutter-Schere in ca. 1 mm große Stücke. Der ADS-Puffer wurde danach vorsichtig abgenommen ohne Gewebestücke zu entfernen und diese wurden in 10 ml Enzym-Mix (ADS-Puffer + 0,6 mg/ml Pankreatin + 0,4 mg/ml Collagenase Typ 2) aufgenommen und mittels 25 ml-Stabpipette in eine sterile 250 ml Glasflasche überführt. Nach 5 min. Schütteln im Wasserbad bei 37°C und 86 U/min wurde der erste Überstand abgenommen und verworfen. Die Gewebestücke wurden erneut mit 10 ml Enzym-Mix bedeckt und 20 min. bei 37°C und 86 U/min im Wasserbad geschüttelt. Der Überstand wurde in ein frisches 50 ml Falcon überführt und der Verdau mit 2 ml Neonatal Calf Serum (NCS) abgestoppt. Die Einzelzellen wurden durch Zentrifugation für 5 min. bei 100 g und RT pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in

4 ml NCS durch sanftes Schütteln resuspendiert. Der Verdau wurde fünf weitere Male mit den Verdauzeiten 25 min. (2x), 15 min. (1x) und 10 min. (2x) durchgeführt; die jeweiligen gelösten Zellen wurden bis zur Weiterverarbeitung bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank gelagert. Nach dem letzten Verdau wurden alle Suspensionen in einem 50 ml Falcon gesammelt, die Zellen für 5 min. bei 100 g und RT pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 4 ml F 10 Medium (+ 10% HS, + 5% FCS, + 1% P/S) durch sanftes Schütteln resuspendiert und die Zellen durch einen 70 µm Zellfilter in ein frisches 50 ml Falcon überführt, wobei der Filter vor und nach der Suspension mit 1 ml Medium gespült wurde. Die Zellsuspension wurde anschließend auf zwei P6 Schalen aufgeteilt und zur Adhärerung der Fibroblasten (Kardiomyozyten adhäreren zu diesem Zeitpunkt nicht) für 60 min bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die nicht adhärenen Kardiomyozyten durch leichtes Klopfen vom Boden der Schale gelöst und mit dem Überstand in ein frisches 50 ml Falcon überführt. Dieser Vorgang wurde so lange durch Zugabe von 1 ml Medium und anschließendes Klopfen wiederholt, bis nur noch eine vernachlässigbare Anzahl nicht adhärenen Kardiomyozyten zurückblieb. Die gesammelten Kardiomyozyten wurden mittels Neubauer Zählkammer gezählt und in einer Dichte von $1,65 - 1,75 \times 10^6$ Zellen in 2,8 ml Medium auf P6 PrimariaTM Schalen (Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont de Claix, Frankreich) ausgesät (Kardiomyozyten können jetzt adhäreren). Die Inkubation während der Versuche erfolgte standardmäßig bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank.

2.3 Transfektion neonataler Rattenkardiomyozyten

Die Transfektion der neonatalen Rattenkardiomyozyten mit entsprechenden siRNAs (s. Tab. 2) erfolgte in drei Stufen: direkt nach dem Aussäen und jeweils 48 h nach der vorangegangenen Transfektion. Die Ernte erfolgte nach weiteren 72 h.

Pro Transfektion wurden 100 µl Medium F10 (+ 1% P/S) vorgelegt, jeweils 3 µl siRNA (Endkonzentration: 20 nM) zugegeben und gevortext. Danach erfolgte die Zugabe von 7,5 µl HiPerfect Transfektionsreagenz (Qiagen, Hilden, Deutschland) und die Ansätze wurden gevortext und für 5 min. bei RT inkubiert. Pro P6 Schale wurden 100 µl Transfektionsmix tropfenweise zugegeben, die Schalen geschwenkt und die Zellen wie beschrieben bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.4 Working Heart

Die Working Heart Anlage nutzt ebenfalls wie die Zellisolutionsanlage die Perfusion nach Langendorff, allerdings wird hier zusätzlich der linke Vorhof durch die zuleitende Vene kanüliert. Über diese Zuleitung wird das Herz mit Tyrode befüllt, wodurch es zur Kontraktion des Herzens innerhalb der Anlage kommt und somit die Tyrode wieder über die Aorta aus dem linken Ventrikel ausgeworfen wird. Sowohl der Füllungsdruck des Vorhofes (Vorlast), als auch der Druck gegen den das Herz auswerfen muss (Nachlast) sind mechanisch regulierbar. Zur Messung von ventrikulärem Druck kann zusätzlich ein Katheter eingeführt werden, so dass aus Füllungsdruck und ausgeworfenem Volumen eine Druckvolumenkurve berechnet werden kann.

Die Mäuse wurden wie unter 2.15 beschrieben getötet, das Herz entnommen und Vorhof sowie Aorta kanüliert. Nach der Einbringung in die Working Heart Anlage erfolgte das Setzen des Katheters sowie einer externen Elektrode zur Stimulation des Herzens mit einer konstanten Frequenz von 400 bpm. Dabei betrug die Vorlast bei allen Tieren konstant 10 mmHg, die Nachlast bei den Kontrolltieren konstant 80 mmHg und bei den Nachlasttieren 120 mmHg für jeweils 30 min. bei einer konstanten Temperatur von 37°C. Danach wurde das Herz unterhalb der Vorhöfe abgeschnitten, in drei Sektionen unterteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Herzen bei -80°C gelagert.

Ebenso wie bei der Langendorff-Isolation erfordert dieser Versuchsaufbau eine schwierige technische Handhabung, so dass die Durchführung von Jeanette Zimolong übernommen wurde.

2.5 Isolation von RNA

Aus neonatalen Zellen:

Zur Isolation der Gesamt-RNA aus neonatalen Rattenkardiomyozyten wurde das High Pure RNA Isolation Kit der Firma Roche Diagnostics entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet.

Aus Gewebe und adulten Zellen:

Zur Isolation der Gesamt-RNA aus Gewebe oder adulten Rattenkardiomyozyten wurde die Extraktion mittels peqGOLD TriFast verwendet. Es handelt sich hierbei um die Aufreinigung mittels Phenol/Chlorophorm. Die Durchführung erfolgte entsprechend dem Herstellerprotokoll, die RNA wurde in 30 µl RNase freiem Wasser gelöst. Aus technischen Gründen wurden die Gewebestücke zunächst nur in 500µl TriFast mittels Elektropotter homogenisiert und das Homogenat mit weiteren 500µl TriFast aufgefüllt. Zur Degradation von DNA-Kontaminationen erfolgte die Zugabe von 1 Vol. DNase-Mix bestehend aus 6 µl DNase-Puffer, 6 µl DNase und

18 µl RNase freiem Wasser. Ansätze wurden 30 min. bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend für 5 min. bei 75°C hitzeinaktiviert.

Die Bestimmung der Konzentration und Qualität der aufgereinigten RNA erfolgte mittels Nanodrop.

2.6 Reverse Transkription von RNA

Die reverse Transkription dient der Umschreibung von RNA in die sogenannte cDNA, welche in weitere Versuche wie Realtime-PCR eingesetzt werden kann. Sie wurde mittels High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Üblicherweise wurde 1 µg Gesamt-RNA zur Umschreibung eingesetzt.

2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (**P**olymerase **C**hain **R**eaction, PCR) können definierte Abschnitte der DNA in vitro amplifiziert werden. Begrenzt werden diese durch sequenzspezifische Primer. Auf die Denaturierung der DNA folgt zunächst die Anlagerung (Annealing) und danach die Elongation (Extension) der Primer. Sowohl der Standardansatz, als auch das in dieser Arbeit standarmäßig verwendete PCR-Programm sind nachstehend zusammengefasst. Tabelle 1 fasst die einzelnen Schmelztemperaturen zusammen.

PCR-Ansatz:

10x PCR-Puffer	2µl
dNTP-Mix (10 mM each)	0,5µl
Primer F (10 µM)	0,4µl
Primer R (10 µM)	0,4µl
Taq-Polymerase (5 ^U /µl)	0,125µl
Templat	1-4µl
ddH ₂ O	ad 20µl

PCR-Programm:

95°C	→	5 min.	
95°C	→	45 sek.	} 30-40 Zyklen
T _M	→	45 sek.	
72°C	→	45 sek.	
72°C	→	10 min.	
4°C	→	∞	

Sonderform quantitative Realtime-PCR:

Bei dieser Form der PCR wird die entstehende Menge an Nukleinsäure mittels Fluoreszenz in Echtzeit dokumentiert, so dass ein quantitativer Vergleich zwischen einzelnen Proben möglich ist. Zur Detektion wurden entweder kommerziell erwerbliche TaqMan[®]-Sonden (Thermo Fischer) oder das interkalierende Reagenz SybrGreen verwendet. Der quantitative Vergleich der Proben erfolgte mittels der $\Delta\Delta C_t$ -Methode [46]. Die entsprechenden Ansätze und Programme sind nachfolgend aufgeführt.

TaqMan-Sonden:

TaqMan Mastermix	6 μ l
TaqMan Sonde	0,5 μ l
Templat	1 μ l
ddH ₂ O	ad 20 μ l

PCR-Programm:

50°C	→	2 min.	
95°C	→	10 min.	
95°C	→	15 sek.	} 40X
60°C	→	1 min.	

SybrGreen:

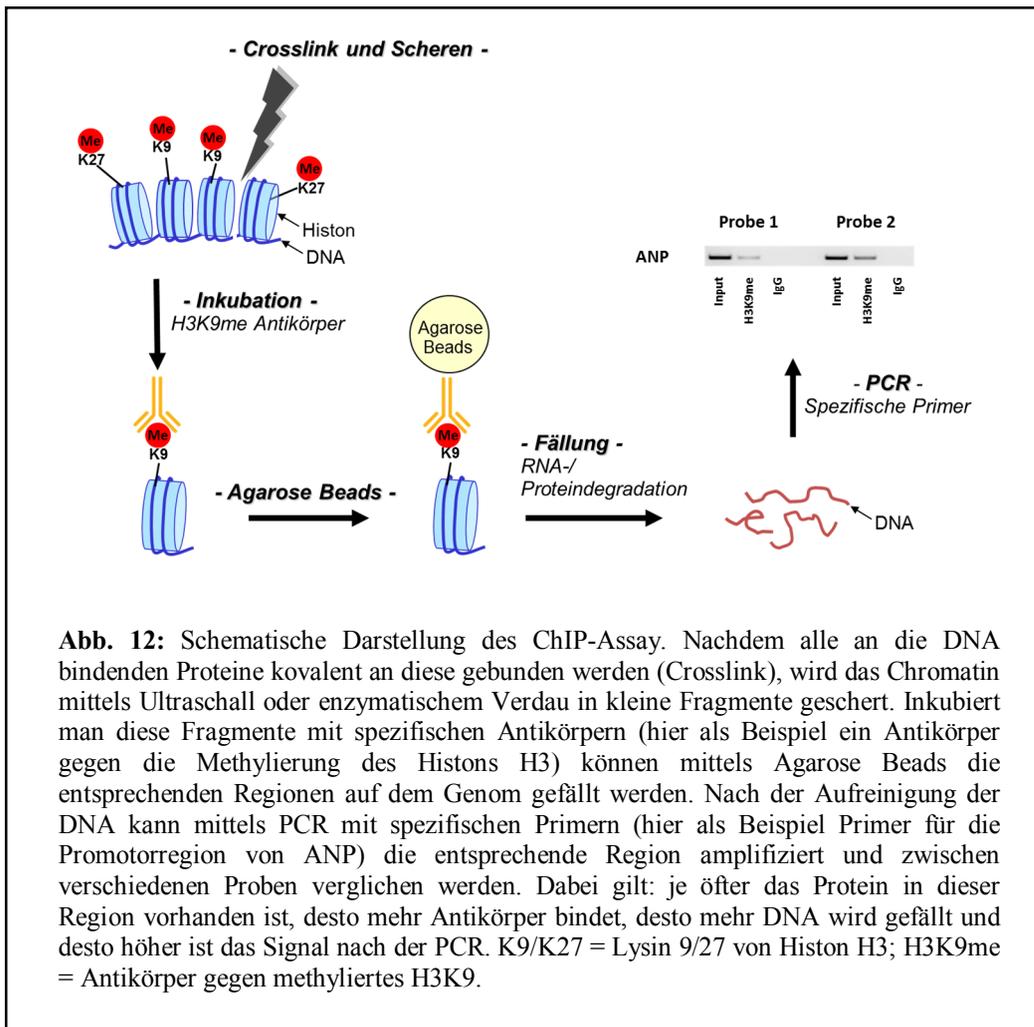
SybrGreen Mix	9 μ l
Primer F	0,5 μ l
Primer R	0,5 μ l
Templat	1 μ l
ddH ₂ O	ad 20 μ l

PCR-Programm:

95°C	→	10 min.	
95°C	→	15 sek.	} 40X
60°C	→	1 min.	

2.8 ChIP-Assay

Bei der **Ch**romatin **I**mmunopräzipitation (kurz ChIP) handelt es sich um eine Methode zur Anreicherung von DNA-Abschnitten über die spezifisch daran gebundenen Proteine. Hierdurch können u.a. Histonmodifikationen identifiziert, charakterisiert und zwischen verschiedenen Proben verglichen werden. Durch kovalente Verbindung der Proteine mit der DNA („Crosslinking“) und anschließendem Scheren des Chromatins können über spezifische Antikörper entsprechende DNA-Fragmente gefällt und nach einem Aufreinigungsschritt mittels PCR analysiert werden. Als Kontrolle dienen dabei eine unbehandelte Probe („Input“) und ein ChIP-Ansatz mit unspezifischem Antikörper („IgG“). Das Grundprinzip des ChIP-Assays ist in Abb. 12 dargestellt.



Neonatale Kardiomyozyten wurden in den Schalen mit 1 ml 1xPBS bedeckt, mittels Schaber in Lösung gebracht und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Adulte Kardiomyozyten wurden nach deren Isolation zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml 1xPBS aufgenommen. Der Crosslink erfolgte durch die Zugabe von 27,4 µl 36,5% Formaldehyd (Endkonzentration: 1%) und 10 min. Schütteln über Kopf bei RT. Durch Zugabe von 62,5 µl 2M Glycin (Endkonzentration: 125 µM) wurde der Crosslink gestoppt. Die Zellen wurden 5 min. bei 800 g zentrifugiert und der Überstand verworfen, das Pellet 2fach mit kaltem 1 x PBS gewaschen und in 1 ml ChIP Buffer resuspendiert. Die Zellen verblieben für 10 min. auf Eis, danach erfolgte das Schneiden des Chromatins mittels Ultraschallsonde (Duty Cycle: 30 Impulse/min, Output Control: 3 – 4). Zwischen den einzelnen Scherzyklen wurden die Ansätze für 1 – 2 sek. in flüssigem Stickstoff „abgekühlt“ und dann auf Eis gehalten. Zum Entfernen der Zelltrümmer wurden die Ansätze 10 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Ansätze wurden danach 1:5 mit ChIP Buffer verdünnt und zur Minimierung von Hintergrundsignal wurden 4 µg unspezifischer Antikörper zugegeben und die Ansätze für 1 h bei 4°C über Kopf geschüttelt. Danach erfolgte die Zugabe von 40 µl Protein A/G Agarose und die Ansätze wurden weitere 2 h bei 4°C über Kopf geschüttelt. Unspezifisch

gebundene DNA wurde durch Zentrifugation von 5 min. bei 1000 g pelletiert und der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. 20% des Ansatzes verblieb als Input unbehandelt und wurde bei -80°C gelagert, das restliche Chromatin wurde aliquotiert und über Nacht mit 4 µg des entsprechenden Antikörpers bei 4°C über Kopf geschüttelt (Antikörper siehe Tabelle 3). Immunkomplexe wurden durch die Zugabe von jeweils 30 µl Protein A/G Agarose und anschließend über Kopf schütteln bei 4°C für 2 h gebunden und durch anschließende Zentrifugation für 5 min. bei 1000 g gefällt. Danach erfolgten drei Waschschriffe mit Low Salt Buffer, jeweils ein Waschschriff mit High Salt Buffer und Li Wasch Buffer und zwei Waschschriffe mit TE-Puffer jeweils mit 1 ml bei 4°C und über Kopf Schütteln für 5 min. (Zentrifugation für 5 min. bei 1000 g; Überstände jeweils verworfen). Zur Elution wurden die Immunkomplexe 30 min. bei RT über Kopf in 250 µl Elution Buffer geschüttelt, danach 5 min. bei 1000 g zentrifugiert und der Überstand in einem frischen 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Elution wurde wiederholt und der zweite Überstand zu dem ersten Überstand hinzugefügt. Zum Aufheben des Crosslinks und der Degradation evtl. gebundener RNA wurden die Ansätze mit 30 µl 5M NaCl (Endkonzentration: 300mM) und 10 µg RNase versetzt und 5 h bei 65°C im Heizblock inkubiert; ab diesem Schriff wurde auch die Input Kontrolle mitbehandelt. Durch Zugabe von 2,5fach Vol. 100% Ethanol wurde die DNA über Nacht bei -20°C gefällt. Nach 30 min. Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C wurde der Überstand verworfen und das getrocknete Pellet in einer Lösung aus 40mM TRIS-HCl pH 6,5, 10mM EDTA und 20 µg Proteinase K resuspendiert und 2 h bei 65°C im Heizblock inkubiert und danach die DNA aufgereinigt.

2.9 Aufreinigung der DNA-Fragmente aus ChIP-Assay

Die Aufreinigung der mittels ChIP gewonnen DNA-Fragmente erfolgte mittels QIAquick PCR purification kit entsprechend dem Herstellerprotokoll.

2.10 Gelelektrophorese

Diese Methode dient der Größenauffrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen durch Anlegen einer Spannung. Die negativ geladene DNA wandert dabei entsprechend ihrer Größe Richtung Anode, die Laufgeschwindigkeit wird durch den Anteil (%) an Agarose definiert. Je nach Zweck wurden Gele zwischen 1% (große Fragmente) und 2% (kleine Fragmente) Agarose zur Auffrennung benutzt. Die Laufspannung betrug 80V, die Anfärbung der Gele erfolgte mittels Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) und die Dokumentation mittels GeneGenius bio-imaging system.

2.11 Co-Immunpräzipitation

Bei der Co-Immunopräzipitation (CoIP) handelt es sich um die Weiterentwicklung der Immunpräzipitation, bei der aus einem Ansatz mittels spezifischen Antikörpers ein Protein aufgereinigt werden kann. Die CoIP dient dabei zum Nachweis einer möglichen Interaktion des aufgereinigten Proteins mit anderen Proteinen, die mit diesem aufgereinigt wurden. Dies kann aus Gewebelysat für native Proteine erfolgen, aber auch mittels Zellkultur und sog. getaggen Proteinen nachgewiesen werden. Bei der zweiten Form werden an zwei Proteine, die mutmaßlich miteinander agieren, ein jeweiliges „tag“ (dt.: „Markierung“) angehängt, gegen die dann die Antikörper gerichtet sind. Da es sich dabei um Standard-tags handelt, ist die Affinität des entsprechenden Antikörpers gegen sein tag relativ hoch, so dass eine höhere Ausbeute und Spezifität erreicht wird. Der Nachteil ist, dass die getaggen Proteine künstlich in einer stabilen Zellkultur exprimiert werden und somit nicht in ihrer exakten, nativen Umgebung interagieren müssen. Für diese Arbeit wurde das Prinzip der CoIP mittels Zellkultur und getaggen Proteinen in Anlehnung an Versuche von Johannes Backs und Kollegen [7] gewählt.

HEK293T Zellen wurden unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂) in DMEM (+20 % FCS, + 1 % P/S) kultiviert, zur Transfektion in 6-well Platten bei 70 – 90 % Konfluenz ausgesät (2 ml Suspension pro well) und 24 h zur Adhärerung bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Pro Transfektion wurden 94 µl serum- und antibiotikafreies Medium in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und jeweils 6 µl GeneJammer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) zugegeben. Die Ansätze wurden dann 5 min. bei RT inkubiert und es erfolgte die Zugabe von jeweils 1 µg HDAC4-myc und Suv39H1-FLAG Plasmid-DNA und bei den entsprechenden Proben 0,8 µg CaMKIIδB-T287D Plasmid-DNA. Danach wurden die Ansätze kurz gevortext, weitere 30 min. bei RT inkubiert und pro well 100 µl Transfektionsmix tropfenweise zugegeben. Nach einer Inkubation von 48 h bei 37°C und 5 % CO₂ wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit je 1 ml 1 x PBS bedeckt und mittels Schaber in Lösung gebracht. Die Zellsuspension wurde dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 4 min. bei 1000 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 1 ml 1 x PBS gewaschen, danach in 200 µl Puffer IP-A resuspendiert und in flüssigem N₂ schockgefroren. Die Zellen wurden dann auf Eis wieder aufgetaut und in dieser Zeit wurden die M2 Agarosebeads vorbereitet. Hierzu wurden 175 µl ANTI-FLAG M2 Agarose 2fach mit Puffer Resin Wash und 3fach mit 1 x TBS gewaschen (Zentrifugation: 1 min. bei 3000 g und 4°C) und auf Eis gehalten. Die aufgetauten Zellen wurden durch 3-maliges „ziehen“ durch eine 27G-Kanüle weiter aufgeschlossen und die Ansätze zum Entfernen von Zelltrümmern 15 min. bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und davon 30 µl als Input zurückbehalten (+ 30 µl 2 x Lämmli + 1:20 β-Mercaptoethanol; Inputs wurden direkt 5 min. bei 95°C inkubiert und bei 4°C bis zur SDS-PAGE

gelagert). Zum Rest wurden 30 μ l M2 Agarose zugegeben, die Proben mit 700 μ l Puffer IP-A aufgefüllt und über Nacht bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Ansätze zunächst bei 300 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Beads 2 x mit Puffer IP-B und 1 x mit Puffer IP-Wash gewaschen (Zentrifugation: 3000 g bei 4°C). Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand vollständig abgenommen und verworfen und Beads in 60 μ l 2 x Lämmli resuspendiert. Die Ansätze wurden dann 2 min. bei 95°C inkubiert, kurz bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach erfolgte die Zugabe von 3 μ l β -Mercaptoethanol (14,5 M), anschließend wurden die Proben 5 min. bei 95°C inkubiert und 1 min. bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die so aufgereinigten Proteine wurden zusammen mit den gelagerten Inputs im Western Blot untersucht.

2.12 Western Blot

Die Methode des Western-Blot dient zur Detektion von Proteinen in einer Suspension, die zuvor mittels SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylmid Gelelektrophorese) entsprechend der Proteingröße (oder anderen Auftrennungsmethoden) aufgetrennt wurde. Dabei werden die Proteine mittels Spannung aus dem Acrylamid-Gel auf eine Trägermembran (meist Nitrocellulose oder PVDF) übertragen und fixiert. Mittels spezifischer Antikörper können die Proteine von Interesse nachgewiesen und analysiert werden; dabei wird zur Signalverstärkung meistens zunächst ein für das Protein spezifischer Primärantikörper benutzt, der dann seinerseits durch einen gegen diesen ersten Antikörper gerichteten Sekundärantikörper erkannt wird. Die Detektion erfolgt dann entweder über Fluoreszenz oder Chemilumineszenz.

Die CoIP-Proben wurden in einem 12 % Trenngel bei einer Laufspannung von 100 V aufgetrennt und danach für 2 h auf eine PVDF Membran bei 400 mA geblottet. Die PVDF-Membran wurde dabei zuvor 10 min. in 100 % Methanol aktiviert und nach dem Blotten für 1 h bei RT mit 5 % Magermilch in 1 x TBS-T geblockt. Die Membranen zur Detektion des c-Myc-tags wurden mit entsprechendem Antikörper in einer Verdünnung von 1:2500 über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Membranen 3 x mit 1 x TBS-T gewaschen (5 min. Schütteln bei RT) und mit entsprechendem Sekundärantikörper (goat-anti-rabbit) in einer Verdünnung von 1:5000 für 1 h bei RT im Überkopfschüttler inkubiert. Die Membranen zur Detektion des FLAG-tags verblieben über Nacht bei 4°C in der Blocklösung und wurden am nächsten Tag mit anti-FLAG-HRP Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 für 1 h bei RT auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenzsystem der Firma GE Healthcare entsprechend dem Herstellerprotokoll und die Entwicklung mittels Röntgenfilm in einer AGFA Entwicklermaschine.

2.13 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung dient der Färbung von Strukturen oder Proteinen innerhalb der Zelle mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper. Durch Gegenfärbung der Zellen mit DAPI (Anfärbung des Zellkerns) können so u.a. die Lokalisation oder Interaktion verschiedener Proteine nachgewiesen werden. Auch hier erfolgte die Durchführung in Anlehnung an Backs und Kollegen [7].

Cos1-Zellen wurden in 24-well Platten auf 13 mm Coverslips bei 70 – 80% Konfluenz ausgesät (500 µl Suspension pro well) und zur Adhärenz 24 h unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂) in DMEM (+10 % FCS, + 1 % P/S) inkubiert. Pro Transfektion wurden 14 µl serum- und antibiotikafreies Medium vorgelegt und jeweils 6 µl GeneJammer zugefügt. Nach 5 min. Inkubation bei RT wurden jeweils 750 ng HDAC4-GFP bzw. Suv39H1-FLAG und bei den entsprechenden Proben 400 ng CaMKIIdB-T287D Plasmid-DNA zugegeben, kurz gevortext und 30 min. bei RT inkubiert. Pro well wurden 20 µl Transfektionsmix zugegeben, die Zellen über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und für 6 h „gehungert“ (serumfreies Medium). Danach wurde das Medium abgenommen und die Zellen 10 min. bei RT mit 500 µl 4 % Formaldehyd in 1 x PBS fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1 ml 1 x PBS wurden die Zellen mit 500 µl 0,3 % Triton X in 1 x PBS für weitere 10 min. permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen erneut 3 x mit 1 ml 1 x PBS gewaschen und 1 h bei RT mit 500 µl 5 % goat serum in 1 x PBS geblockt (Verminderung von Backgroundsignalen). Nach dem Blocken erfolgte die Inkubation mit anti-FLAG Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 in 5 % goat serum in 1 x PBS + 0,05 % Triton X über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Zellen zunächst 3 x mit 1 ml 1 x PBS gewaschen und dann 1 h bei RT mit anti-rabbit-TexasRed Antikörper in einer Verdünnung von 1:400 in 5 % goat serum in 1 x PBS + 0,1 % Triton X inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml 1 x PBS erfolgte die DAPI-Färbung und nach weiteren drei Waschschritten mit 1 ml 1 x PBS das Eindeckeln mit FluorSaveTM (Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Dokumentation der Ergebnisse wurde mittels Fluoreszenzmikroskop bei einer Vergrößerung von 400x durchgeführt.

2.14 Messungen an der IonOptix Zellverkürzungsanlage

Der grundlegende Aufbau der IonOptix Zellverkürzungsanlage ist in nachfolgender Abbildung 13 dargestellt.

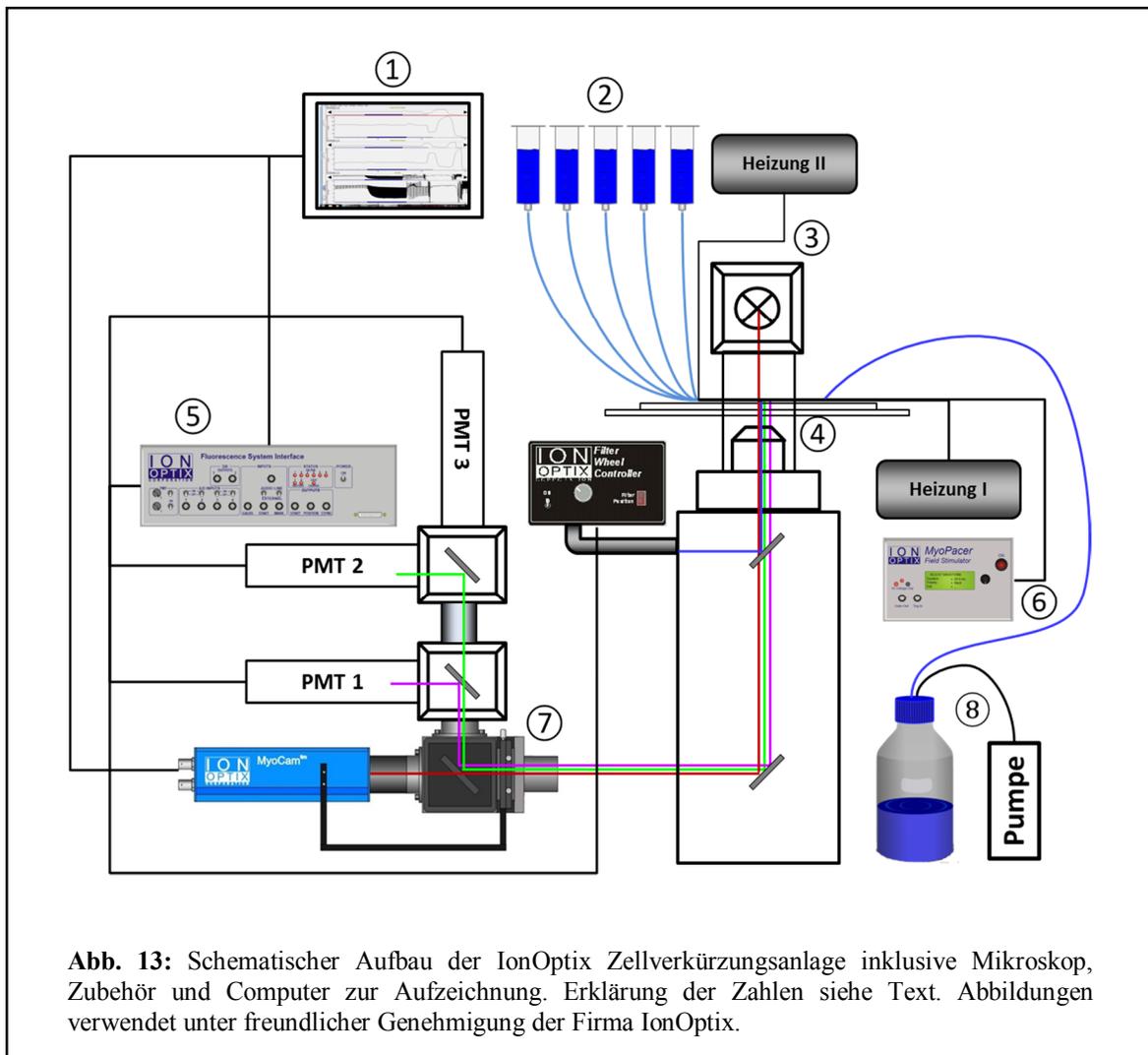
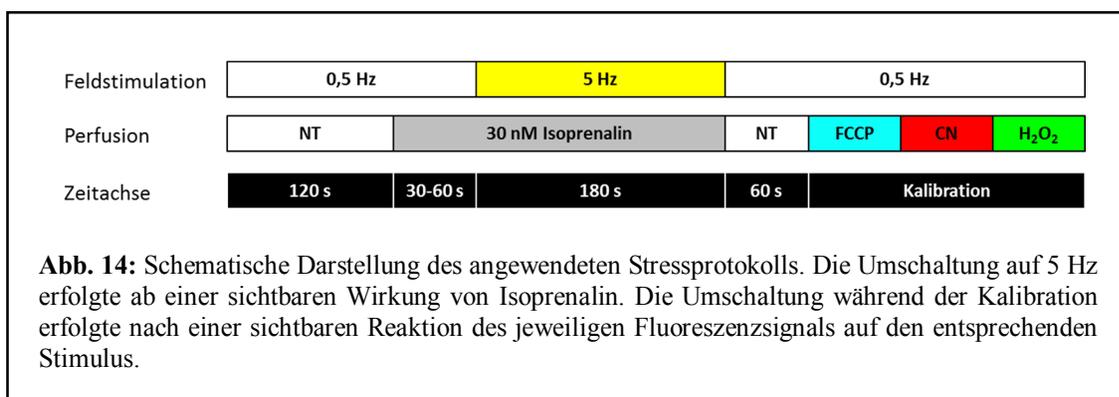


Abb. 13: Schematischer Aufbau der IonOptix Zellverkürzungsanlage inklusive Mikroskop, Zubehör und Computer zur Aufzeichnung. Erklärung der Zahlen siehe Text. Abbildungen verwendet unter freundlicher Genehmigung der Firma IonOptix.

Die isolierten Kardiomyozyten wurden in einer Zellkammer auf laminierten Deckgläsern ausplattiert und für 5 min. zur Adhärenz bei RT inkubiert. Die Zellkammer wurde in das Mikroskop eingespannt (④) und die Zellen über den Zufluss (②) mit der jeweiligen Lösung umspült; die Absaugung erfolgte dabei mittels Unterdruckpumpe (⑧). Sowohl die zuströmenden Lösungen (Heizung II), als auch die Zellkammer (Heizung I) wurden auf eine Temperatur von 37°C erwärmt. Die Lichtquelle des Mikroskops (③) mit nachgeschaltetem Filter (T660LPXR; Transmission > 660 nm) belichtet die Kardiomyozyten (roter Strahlengang), das Durchlicht gelangt dann über einen Spiegel (Mikroskop unten) über den Side Port des Mikroskops durch den Cell Framing Adapter auf die MyoCam (⑦), über die ein Livebild der Kardiomyozyten auf dem PC in das Programm IonWizard (①) abgebildet wird. Gleichzeitig erfolgte über eine UV-Lampe (Xenon

Short Arc -75XE, Ushio Inc., Tokyo, Japan; nicht eingezeichnet, koppelt von hinten in das Mikroskop ein) die Anregung verschiedener Fluorophore (s.u.). Die Auswahl der entsprechenden Anregungswellenlänge erfolgte dabei über den Filter Wheel Controller, das Anregungslicht selbst (blauer Strahlengang) gelangte über einen dichroischen Spiegel (89017bs F/TR), welcher die Exzitationswellenlänge spiegelt, die Emissionswellenlängen aber durchlässt, auf die Zellen. Ebenso wie das Durchlicht gelangten die entsprechenden Emissionen (lila und grüner Strahlengang) via Spiegel über den Side Port in den Cell Framing Adapter, wurden hier aber von einem weiteren dichroischen Spiegel (650 DCXR) so abgelenkt, dass sie in die angeschlossenen Photomultiplier (PMT 1 – 3) mündeten, welche die Signale dann zur Darstellung im Programm IonWizard über das Fluorescence System Interface ⑤ leiteten. Zur Trennung von mehreren Fluoreszenzsignalen kommt ein dritter dichroischer Spiegel vor PMT 1 (490 DCLP) und ein reiner Spiegel vor PMT 2 zum Einsatz. Während der Messungen erfolgte die Feldstimulation über den an die Zellkammer angeschlossenen Stimulator ⑥. Alle erwähnten Spiegel und Filter wurden über die Firma Chroma Technology GmbH (Fürstfeldbruck, Deutschland), die Zellverkürzungsanlage (sofern nicht anders deklariert) von der Firma IonOptix (Dublin, Irland) bezogen.

Während allen Messungen wurden die Zellen einem physiologischen Stressprotokoll unterzogen, bei dem die Zellen zunächst unter 0,5 Hz Feldstimulation für 120 s mit NT perfundiert wurden. Danach erfolgte das Einwaschen des β -adrenergen Agonisten Isoprenalin (30 nM) und die Erhöhung der Feldstimulation auf 5 Hz sobald dieser Wirkung zeigte (stärkere Zellverkürzung und kürzere Time to Peak) zur Simulation einer physiologischen Stresssituation. Nach weiteren 180 s wurden die Zellen wieder unter Anfangsbedingungen gemessen und nach weiteren 60 s erfolgte die jeweilige Kalibration der Fluoreszenzparameter (s.u. und Abb. 14).



Im Programm IonWizard wurden dabei folgende Parameter in Echtzeit aufgezeichnet und protokolliert:

Zur Bestimmung der Arbeitslast erfolgte die Messung der Sarkomerlänge über einen im Programm hinterlegten Algorithmus, welcher die unterschiedlichen Helligkeiten („Bänderung“) innerhalb der Sarkomere als Berechnungsgrundlage heranzieht.

Die Bestimmung des Redox-Potentials erfolgte anhand des Oxidationsstatus von NAD(P)H und FAD mittels Autofluoreszenz (NAD(P)H: $\lambda_{\text{Ex}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 450 \text{ nm}$; FAD: $\lambda_{\text{Ex}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 525 \text{ nm}$). Aufgrund des gegensätzlichen Verhaltens kommt es bei einer Oxidation von NAD(P)H zum Abfall, bei einer Oxidation von FAD zu einem Anstieg der jeweiligen Autofluoreszenz und umgekehrt, so dass sich über die Ratio aus beiden Parametern eine zuverlässige Aussage über den Redoxstatus der jeweiligen Zelle machen lässt. Zur Auswertung des Redoxstatus mussten die Signale für NAD(P)H und FAD zusätzlich kalibriert werden (maximales und minimales Signal). Hierzu wurden die Zellen zunächst mit dem Ionophor FCCP ($5 \mu\text{M}$) perfundiert. Dieser führt durch den Transport von Protonen über die mitochondriale Membran zur Dissipation des Membranpotentials und damit zur maximalen Oxidation von NADH und FAD (= Minimum im NADH-Signal, Maximum im FAD-Signal). Danach erfolgte die Perfusion mit Cyanid (4 mM), welches die Atmungskette blockiert und somit zu einer vollständigen Reduktion von NADH und FAD führt (= Maximum im NADH-Signal, Minimum im FAD-Signal). Da auf Grund eines möglichen Fehlens der *Nnt* das mitochondriale NADPH durch FCCP nicht oxidiert werden kann (vgl. Einleitung), wurden die Zellen zusätzlich mit $10 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ perfundiert, welches auch den NADPH Pool – sofern vorhanden – oxidiert.

Zur Bestimmung der zellulären ROS-Produktion wurden die Zellen zuvor mit $1 - 4 \mu\text{M DCF}$ für 25 min. bei 37°C gefärbt. Dieser Farbstoff erhält seine charakteristische Fluoreszenzeigenschaft ($\lambda_{\text{Ex}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 525 \text{ nm}$) durch Oxidation, welche durch das in den Zellen entstehende H_2O_2 erfolgt. Diese Oxidation ist irreversibel und das DCF-Signal folgt damit einem kumulativen Anstieg. Am Ende des Protokolls erfolgte auch hier die Kalibration des Farbstoffes durch eine definierte Menge H_2O_2 (10 mM), so dass eine Aussage über das Ansprechen von DCF innerhalb der jeweiligen Zelle gemacht werden konnte (interne Kontrolle).

Als zusätzliche Parameter wurden handschriftlich Notizen über Zustand und Verhaltensweisen der gemessenen Zellen (z.B. Vorkommen von Extrasystolen oder Arrhythmien bzw. „Sprünge“ in einem der Fluoreszenzsignale), die Beladung durch DCF zu Beginn jeder Messung sowie den Erfolg der Kalibration durchgeführt, so dass jede Zelle in ihrer Gesamtheit beurteilt werden konnte.

2.15 Isolation von Mitochondrien aus Gesamtherz

Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Mäuse wurden durch Injektion des Gemisches Ketavet® (Ketaminhydrochlorid: 1000 mg/kg) und Rompun® (Xylazinhydrochlorid: 100 mg/kg) getötet, das Herz wie unter 2.1 beschrieben entnommen und in eine P6 Schale mit IS Puffer überführt. Dort erfolgte das Säubern der Ventrikel von unerwünschten Geweberesten sowie den Vorhöfen. Das gesäuberte Herz wurde danach in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 500 µl IS Puffer überführt, mittels Feinschere zerkleinert und die Gewebestücke inklusive Puffer in einen Glashomogenisator (A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland) überführt. Die Homogenisation erfolgte mittels Kunststoffpistill in zwei Schritten zu je 7 min. wobei nach den ersten 7 min. weitere 500 µl IS Puffer in den Homogenisator hinzugefügt wurden. Danach wurde das Homogenat wieder in das 2 ml Reaktionsgefäß überführt und zur Entfernung von Zelltrümmern 5 min. bei 400 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut 10 min. bei 7700 g und 4°C zentrifugiert. Der neue Überstand (cytosolische Fraktion) wurde in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert, das Pellet wurde in 700 µl MSS Puffer resuspendiert. Danach erfolgte die Zugabe von weiteren 700 µl MSS und die Suspension wurde erneut 5 min. bei 7700 g und 4°C zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt und das Pellet am Ende in 100 µl MSS Puffer aufgenommen.

Bei der Isolation von Mitochondrien aus bereits verdautem Herzen der Zellisolation (Punkt 2.1) wurde wegen des sehr weichen Gewebes nur eine Homogenisation von 1 x 7 min. durchgeführt. Das restliche Protokoll blieb unverändert.

2.16 Proteinisolation für GSH/GSSG Messungen

Die Herzstücke zur Bestimmung des Gesamtglutathions wurden in 200 µl 1 x Lysepuffer (Millipore, Darmstadt, Deutschland) aufgenommen, mittels Miccra D1 Homogenisator (Miccra GmbH, Müllheim, Deutschland) homogenisiert (14500 – 18000 rpm) und das Homogenat 10 min. bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

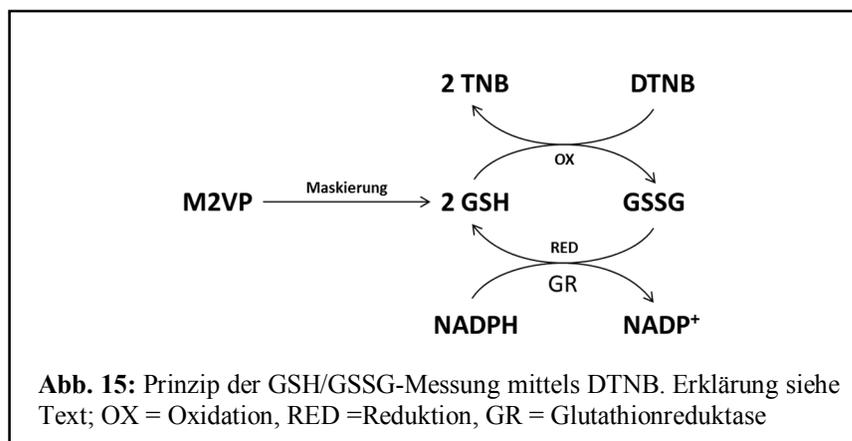
Die Herzstücke zur Bestimmung des oxidierten Glutathions (GSSG) wurden in 300 µl GSH Puffer + 3mM M2VP (s. 2.18) aufgenommen und mittels Miccra D1 homogenisiert (14500 – 18000 rpm).

2.17 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung für Mitochondrien und isolierte Proteine erfolgte mittels BioRad DCTM Protein Assay. Hierzu wurden die Proben 1:10 in 20 µl ddH₂O verdünnt und mit 100 µl Reagenz A versetzt. Nach kurzem Vortexen erfolgte die Zugabe von 800 µl Reagenz B, die Ansätze wurden erneut gevortext und 15 min. bei RT inkubiert (bis zu 1 h möglich). Im Anschluss wurde die optische Dichte der Proben bei 750 nm photometrisch bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte immer in Triplikaten, als Leerwert dienten 20 µl ddH₂O, die Standardkurve wurde einmalig bestimmt und im Gerät gespeichert.

2.18 Bestimmung von gesamt GSH und GSSG

Das Prinzip der Bestimmung von GSH und GSSG beruht auf der Tatsache, dass zwei Moleküle GSH mit einem Molekül GSSG durch Oxidation oder Reduktion im Gleichgewicht stehen. Bereits 1958 beschrieb G.L. Ellman das Reagenz DTNB, welches durch Oxidation von GSH zu GSSG in TNB (2-Nitro-5-thiobenzoat) umgewandelt wird [19]. Dieser Stoff kann dann kolorimetrisch bei 412 nm quantifiziert werden. Zur Bestimmung des gesamten Glutathions wird der Reaktion noch Glutathionreduktase und NADPH im Überschuss zugesetzt, so dass auch das bereits oxidierte Glutathion wieder reduziert wird und für die Reaktion mit DTNB zur Verfügung steht (Abb. 15). Zur Bestimmung des oxidierten Glutathions wird bei der Aufbereitung der Proben der Stoff M2VP zugesetzt. Dieser reagiert mit freien Thiolgruppen und bindet somit das reduziert vorliegende GSH („Maskierung“). Somit wird nach Zugabe der Glutathionreduktase ausschließlich das bereits oxidierte GSSG gemessen (Abb. 15).



Die jeweilige Messung von GSH bzw. GSSG erfolgte in GSH-Puffer mit 0,6 mM DTNB und 0,4 mM NADPH. Kurz vor der entsprechenden Messung wurden 1,8 U Glutathionreduktase zugegeben, 940 μ l des Gemisches pro Küvette vorgelegt und jeweils 50 μ g (GSH) bzw. 400 μ g (GSSG) Lysat zugegeben und die Absorption bei 412 nm über 10 min. gemessen (Messintervall: 30 sek.). Zur besseren Detektion von GSSG wurden die entsprechenden Proben vor der Messung einem Zyklus Freeze/Thaw unterzogen. Die Auswertung erfolgte an Hand von Eichkurven für GSH und GSSG, die im Zuge früherer Messungen bereits vorlagen.

2.19 Atmungsmessung

Durch die Messung der mitochondrialen Atmung kann eine Aussage über die Integrität der Mitochondrien und damit eine eventuelle Dysfunktion gemacht werden. Die Atmungsmessungen erfolgten an einer Clark-Elektrode unter Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs in einem geschlossenen System. Alle Versuche wurden bei 37°C durchgeführt, die Belegung der Elektrode erfolgte durch Dr. Alexander Nickel. Vor jedem Messtag wurde eine Kalibration der Elektrode durch die Bestimmung der maximalen Sauerstoffmenge (offenes System) und der minimalen Sauerstoffmenge (Zugabe von Natriumdithionit zur Reduktion des vorhandenen Sauerstoffs) durchgeführt. Zwischen den einzelnen Messungen wurde die Pufferkammer jeweils 15 x mit 70 % EtOH und 10 x mit ddH₂O gespült.

Die Pufferkammer wurde zunächst mit Puffer AP befüllt und die Messung gestartet. Bei einem stabilen Signal wurden 400 μ g Mitochondrien zugegeben und die Kammer mit dem Deckel verschlossen (Volumen: 2 ml). Nach 2 – 3 min. mit stabilem Signal erfolgte die Zugabe des jeweiligen Substrates mittels Hamilton Pipette in einer Endkonzentration von 5 mM (state 2 Atmung). Nach weiteren 2 – 3 min. mit stabilem Signal wurde stufenweise ADP zugegeben um die Endkonzentrationen 100 μ M, 300 μ M und 1 mM zu erreichen (state 3 Atmung). Zwischen den einzelnen Zugaben lag jeweils mindestens 1 min. Zeitabstand. Vor dem endgültigen Aufbrauchen des Sauerstoffes erfolgte die Zugabe von Oligomycin in einer Endkonzentration von 1,2 μ M (state 4 Atmung) und die Messung wurde nach weiteren 3 – 4 min. gestoppt.

2.20 Messung von NAD(P)H und Membranpotential

Die Bestimmung des NAD(P)H-Levels und des Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) erfolgte in einer parallelen Messung der Autofluoreszenz von NAD(P)H ($\lambda_{Ex} = 340$ nm, $\lambda_{Em} = 450$ nm) und dem Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodaminmethylester (TMRM; $\lambda_{Ex} = 560$ nm, $\lambda_{Em} = 600$ nm) im Tecan infinite M200 pro Plattenreader als Triplikate bei 37°C (Messintervall zwischen zwei

Messpunkten: 1 min.). Hierzu wurden 60 μg Mitochondrien in 160 μl Puffer AP aufgenommen und 10 min. bei RT im Dunkeln mit 0,1 μM TMRM angefärbt. Danach wurden pro well einer 96-well Platte (UV flat transparent) 160 μl (= 60 μg) gefärbte Mitochondrien zugegeben und die Messung gestartet. Nach 20 min. erfolgte die Zugabe des jeweiligen Substrates in einer Endkonzentration von 5 mM und die Messung wurde für 15 min. fortgesetzt. Dann wurden jeweils die Effektoren ADP (Endkonzentration: 1 mM), Rotenon (Endkonzentration: 8 μM) oder KMV (Endkonzentration: 10 mM) zugegeben und die Messung für weitere 10 min. fortgeführt. Im Anschluss erfolgte die Kalibration mittels CN für 3 min. (Endkonzentration: 2,5 mM) und Oligomycin/DNP für 15 min. (Endkonzentrationen: 1,2 μM /250 μM).

2.21 Bestimmung von H_2O_2 in isolierten Mitochondrien

Die Messung mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) erfolgte als Messung des Gesamt- H_2O_2 unter Verwendung des Indikators Amplex UltraRed (AmpRed). Dabei wird dem Puffer neben AmpRed noch zwei weitere Substanzen beigefügt: 1. Superoxid Dismutase (SOD) \rightarrow dient der Umwandlung von Superoxid in H_2O_2 . 2. Horse Radish Peroxidase (HRP) \rightarrow katalysiert die Umsetzung des durch H_2O_2 oxidierten AmpRed zu Resorufin, welches dann fluorimetrisch bestimmt werden kann ($\lambda_{\text{Ex}} = 535 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 590 \text{ nm}$).

Die Messungen erfolgten in 96-well Platten (Flat black) im Tecan Fluoreszenzplattenreader in Duplikaten. Hierzu wurden pro well 30 μg Mitochondrien vorgelegt und mit 170 μl AmpRed-Mastermix (10 mM AmpRed, 100 U/ml SOD, 500 mU/ml und 5 mM Substrat in Puffer AP) versetzt; für die Leerwertbestimmung erfolgte die Zugabe von Mastermix ohne Substrat. Danach wurden entsprechend 100 μM , 300 μM oder 1 mM ADP zugegeben und die Messung gestartet. Diese erfolgte für 30 – 60 min. bei 37°C und einem Messintervall von 2 min. zwischen den einzelnen Messpunkten.

Spezielle Protokolle:

- Depletion der antioxidativen Kapazität: hier wurden die Mitochondrien vor Versuchsbeginn für 5 min. mit 25 μM DNFB behandelt. Dies führt zur Alkylierung von freiem GSH, so dass dieses nicht mehr zur Entgiftung von H_2O_2 bereitsteht.
- Dynamisches Protokoll: in Anlehnung an die Durchführung der NAD(P)H/TMRM-Messungen wurde für AmpRed ein entsprechendes Protokoll verwendet. Dabei wurde zu den vorgelegten Mitochondrien Mastermix ohne Substrat zugegeben und die Messung direkt gestartet (Messintervall: 1 min.). Nach 10 min. erfolgte die Zugabe von 5 mM Substrat und die Messung wurde für 15 min. fortgeführt. Danach erfolgte die Zugabe der jeweiligen

Effektoren (s. Abschnitt 2.17) und die Messung wurde für weitere 30 min. fortgeführt. Am Ende der Messung erfolgte als Positivkontrolle für den Assay die Zugabe von 500 μM H_2O_2 .

2.22 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Messungen der Enzymaktivitäten der vier Citratzyklusenzyme IDH, Aconitase, αKGDH und MDH erfolgten in Duplikaten in 96-well Platten (UV flat transparent) im Tecan Fluoreszenzplattenreader bei 37°C. Hierbei wurde die Zunahme von NAD(P)H während der jeweiligen spezifischen Reaktion photometrisch durch die Messung der Absorption bei 340 nm bestimmt. Jede Messung erfolgte über einen Zeitraum von 30 min. bei einem Messintervall von 1 min. mit durch Freeze/Thaw aufgebrochenen Mitochondrien; die einzelnen Assays sind nachfolgend aufgeführt.

IDH-Aktivität:

Pro well wurden 200 μl Mastermix bestehend aus 10 mM TRIS-HCl (pH 8,0), 0,2 mM NADP^+ , 5 mM MgCl_2 und 2 mM Isocitrat vorgelegt, jeweils 5 μg Mitochondrien zugegeben, gemischt und die Messung gestartet.

Aconitase-Aktivität:

Pro well wurden 200 μl Mastermix bestehend aus 36 mM TRIS-HCl (pH 7,4), 0,2 mM NADP^+ , 0,8 mM Cystein, 0,4 mM MgCl_2 und 30 mM Citrat vorgelegt, jeweils 25 μg Mitochondrien zugegeben, gemischt und die Messung gestartet.

αKGDH -Aktivität:

Pro well wurden 198 μl Mastermix bestehend aus 0,5 mM EDTA, 5 mM MgCl_2 , 25 mM KH_2PO_4 (pH 7,2), 1 mM NAD^+ , 2,5 mM αKG , 0,2 mM TPP und 8 μM Rotenon vorgelegt und jeweils 10 μg Mitochondrien zugegeben. Danach erfolgte die Zugabe von 2 μl 10 mM CoA-SH (Endkonzentration: 0,1 mM), die Ansätze wurden gemischt und die Messung gestartet.

MDH-Aktivität:

Pro well wurden 200 μl Mastermix bestehend aus 50 mM TRIS-HCl (pH 7,4), 0,2 mM NADP^+ , 5 mM MgCl_2 und 5 mM Malat vorgelegt, jeweils 10 μg Mitochondrien zugegeben, gemischt und die Messung gestartet.

2.23 bioinformatische Arbeiten

Folgende Datenbanken und (Internet)Programme wurden für bioinformatische Arbeiten herangezogen:

- ☒ **NCBI**, National Center for Bioinformatical Information; Gen-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
- ☒ **UCSC Genome Browser**; Gen-Datenbank (<http://genome.ucsc.edu/>)
- ☒ **Microsoft® Office 2010**; Erstellen von Textdokumenten und Tabellen
- ☒ **PerlPrimer**; Entwerfen von Primern (<http://perlprimer.sourceforge.net/>)
- ☒ **IonWizard**; Aufzeichnung und Auswertung der Daten der Zellverkürzungsanlage
- ☒ **GraphPad Prism 6.0**; Erstellung von Diagrammen und statistische Auswertung
- ☒ **OxyGraph+ Software**; Aufzeichnung und Auswertung der Sauerstoffmessungen

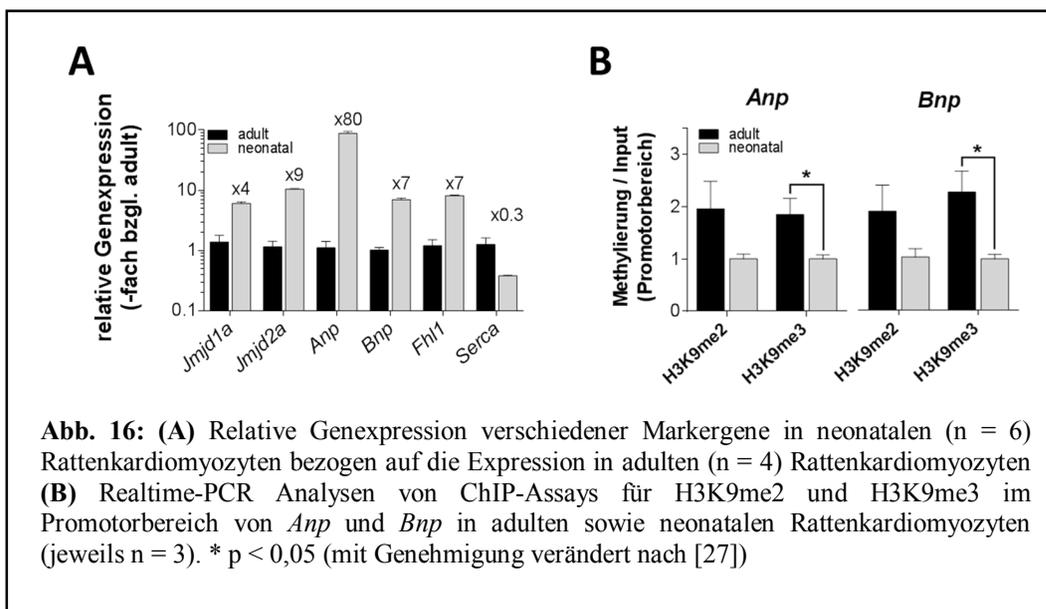
2.24 Mathematische und statistische Berechnungen

Die Auswertung folgender Parameter wurde mit Hilfe von Microsoft Excel® 2010 durchgeführt: Realtime-PCR (ChIP und Genexpression), Western-Blots und CoIPs, Enzymaktivitäten, Sauerstoffverbrauch und respiratorischer Quotient, NADH/TMRM Parallelmessung, Bestimmung von GSH/GSSG, ROS-Produktion (AmpRed und DCF) sowie Redoxstatus von NAD(P)H/FAD. Die Auswertung der Kontraktionsdaten (systolische/diastolische Sarkomerlänge, Time to Peak, Zellverkürzung und Relaxationszeit) erfolgte direkt im Programm IonWizard. Alle statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe von GraphPad Prism Version 6.0 durchgeführt. Sofern nicht anders vermerkt sind alle Ergebnisse als Mittelwert mit SEM (standard error of the mean) angegeben.

III. ERGEBNISSE

Expressionsprofil und Histonmethylierung der NRCMs ähnelt humaner Herzinsuffizienz

Zum Test, ob das Modellsystem der neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRCM) zur Untersuchung der Rolle von JMJD1A und JMJD2A dienen kann, wurde aus NRCMs und adulten Rattenkardiomyozyten RNA isoliert und die Expression verschiedener Markergene bestimmt. Wie in Abbildung 16 A zu sehen ist, war, wie erwartet, eine deutlich erhöhte Expression der beiden Gene *Anp* (80-fach) und *Bnp* (7-fach) in den neonatalen Zellen im Vergleich zu adulten Zellen zu beobachten. Interessanterweise war die Expression der beiden Demethylasen *Jmjd1a* und *Jmjd2a* ebenfalls in neonatalen Kardiomyozyten um das vier- bzw. neunfache erhöht bei einer gleichzeitigen Expressionserhöhung des Gens *Fhl1*, welches unter direktem Einfluss von JMJD2A steht [94]. Die Expression von *Serca2a* hingegen war in neonatalen Zellen deutlich erniedrigt im Vergleich zu adulten Zellen.

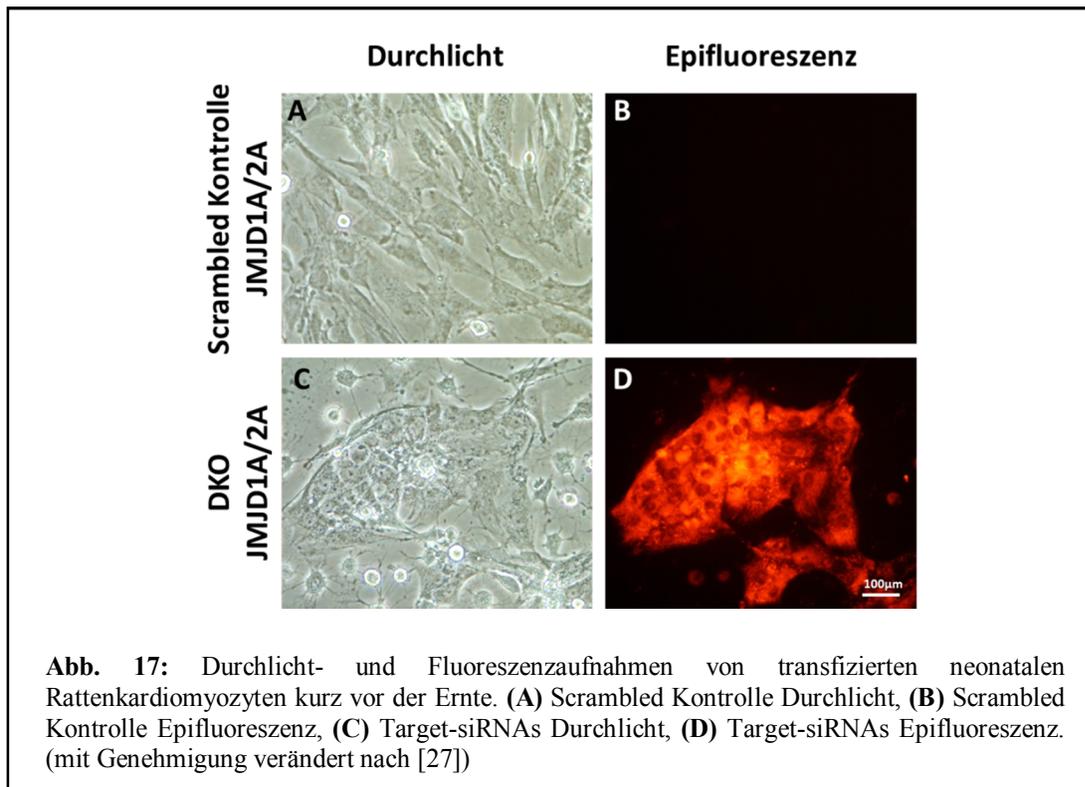


Als nächstes wurde untersucht, ob sich im Promotorbereich von *Anp* und *Bnp* entsprechende Unterschiede in der Methylierung von H3K9 feststellen lassen. Hierzu wurden ChIP-Assays mit neonatalen und adulten Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich sowohl für die Di-, als auch die Trimethylierung von H3K9 in beiden Promotorbereichen eine Erniedrigung in den neonatalen Kardiomyozyten (Abbildung 16 B).

Vergleicht man diese Daten mit den aus den humanen Proben erhobenen Daten bzgl. Expression und Methylierung, so kann eine gewisse Ähnlichkeit zwischen neonatalen Zellen und insuffizienten Herzen gezogen werden. In beiden Fällen kam es zu einer Erhöhung der Genexpression von *JMJD1A* und *JMJD2A*, verbunden mit einer erniedrigten Methylierung von H3K9 im Promotorbereich von *ANP* und *BNP* und der dadurch bedingten erhöhten Genexpression dieser beiden Gene. Dies zeigte das Potential von NRCMs zur Untersuchung einer direkten Rolle von JMJD1A und JMJD2A bei der Reexpression des fetalen Genprogramms.

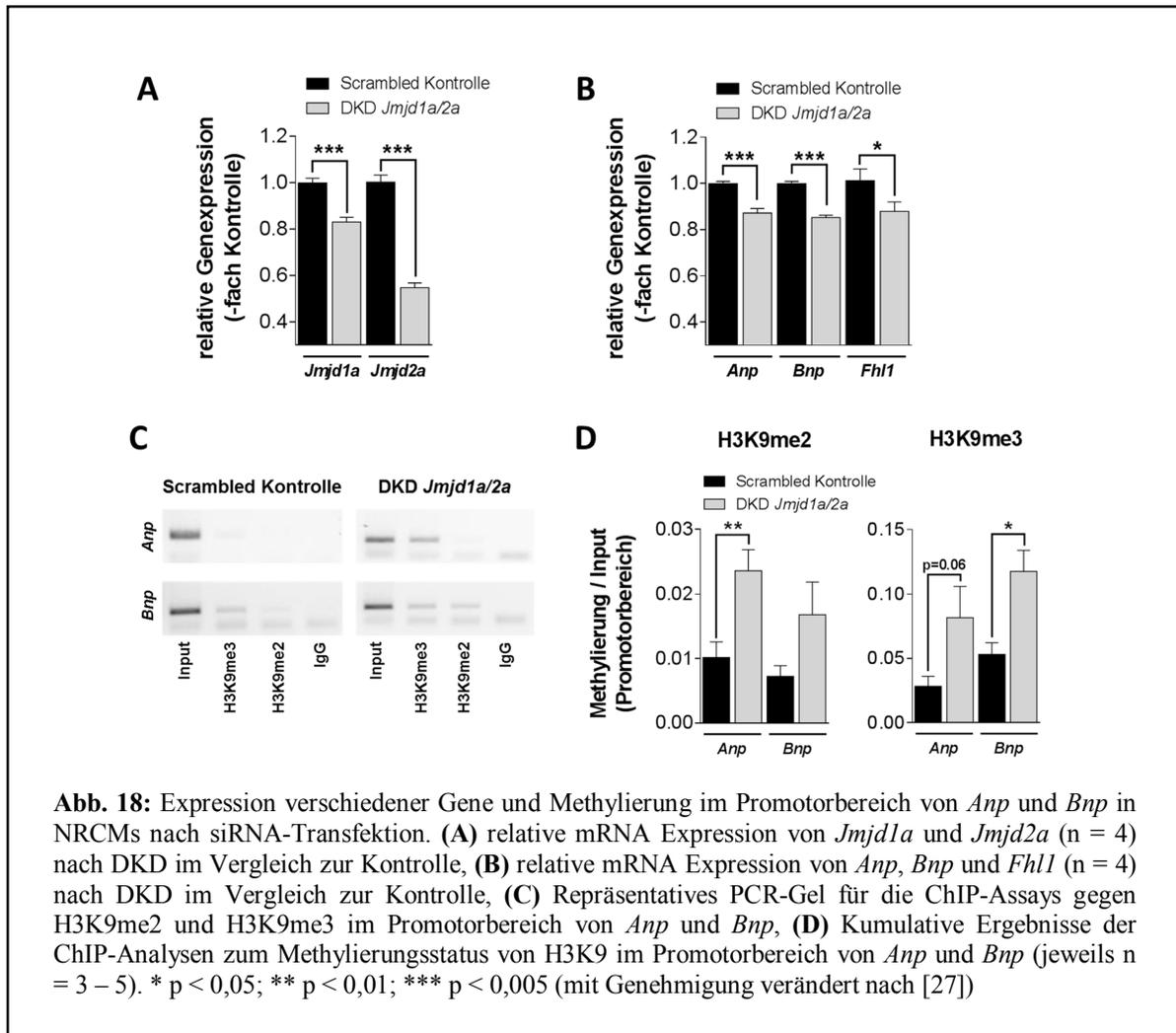
JMJD1A und 2A sind redundant und kontrollieren die Expression von Anp und Bnp nur zum Teil

Um eine Beteiligung der beiden H3K9-Demethylasen an der Expressionskontrolle von *Anp* und *Bnp* zu zeigen, wurden NRCMs isoliert und in drei Schritten mit spezifischen siRNAs für *Jmjd1a* und *Jmjd2a* („Target-siRNAs“) transfiziert. Als Kontrolle wurden Zellen mit sog. Scrambled Kontroll-siRNAs transfiziert; diese besitzen die gleiche Nukleotidzusammensetzung wie die spezifischen siRNAs, allerdings in einer zufälligen Anordnung (englisch „to scramble“ = etwas durcheinander bringen). Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz waren die beiden Target-siRNAs mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert, so dass eine mikroskopische Beurteilung durchgeführt werden konnte (Abb. 17).



Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, konnte eine hohe Transfektionseffizienz der Target-siRNAs in den NRCMs erreicht werden, bei der über 90 % der ausgesäten Zellen die rot fluoreszierenden siRNAs aufwiesen. Da die entsprechenden Scrambled Kontrollen keine Fluoreszenz besaßen, konnte die Transfektionseffizienz hier nicht exakt bestimmt werden, sondern es wurde davon ausgegangen, dass sich diese siRNAs ähnlich verhalten wie die Target-siRNAs.

Nach dem Ernten erfolgte sowohl die Isolation von RNA zur Untersuchung der Genexpression, als auch ChIP-Assays zur Kontrolle des Methylierungsstatus. Hierbei zeigte sich zunächst eine mögliche redundante Funktion von JMJD1A und JMJD2A, da der Knock-Down (KD) von jeweils nur einer Demethylase zur Erhöhung der Expression der jeweils anderen Demethylase führte. Die Expression von *Anp* und *Bnp* blieb in beiden Fällen unverändert (s. Anhang Abb. A.1). Im Gegensatz dazu konnte durch die simultane Transfektion beider Target-siRNAs (DKD = doppelter Knock-Down) ein signifikanter Rückgang der entsprechenden Genexpression von *Jmjd1a* und *Jmjd2a* erreicht werden. Gleichzeitig kam es zu einer schwachen, aber stabilen Verminderung der Expression der beiden Zielgene *Anp* und *Bnp* sowie des ebenfalls von JMJD2A regulierten Gens *Fhl1* (Abb. 18 A+B). ChIP-Analysen zeigten dabei, dass es im Promotorbereich von *Anp* und *Bnp* durch das Fehlen der beiden Demethylasen entsprechend zu einer Remethylierung von H3K9 kam (Abb. 18 C+D).

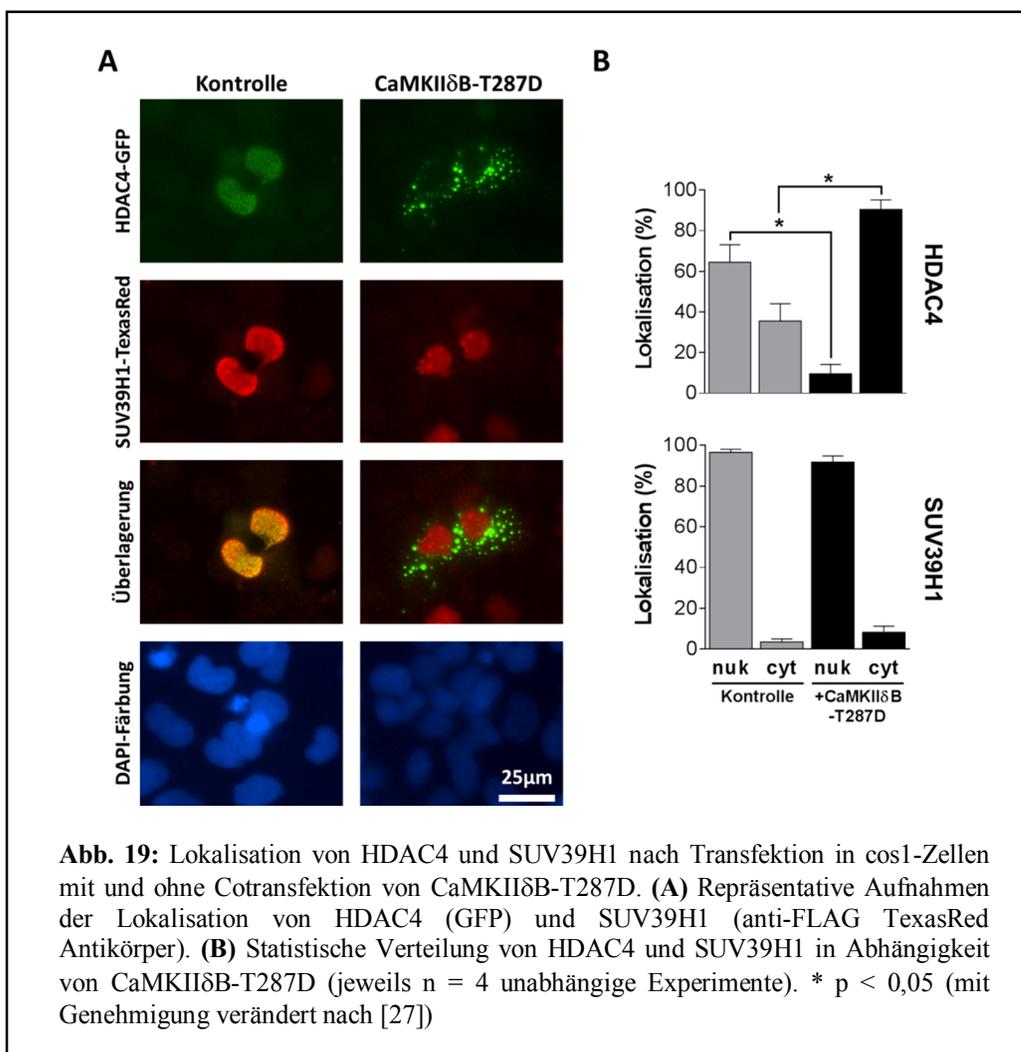


Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl JMJD1A, als auch JMJD2A direkt an der Regulation von *Anp* und *Bnp* beteiligt sind. Allerdings sprechen sowohl die Tatsache, dass es sich nur um geringe Expressionsänderungen handelte, als auch unsere Daten aus den Working Heart Experimenten (stabile Demethylierung auch ohne die Erhöhung der Expression von *Jmjd1a* und *Jmjd2a* [27]) dafür, dass es mindestens einen weiteren Kontrollmechanismus für die Expression von *Anp* und *Bnp* geben muss.

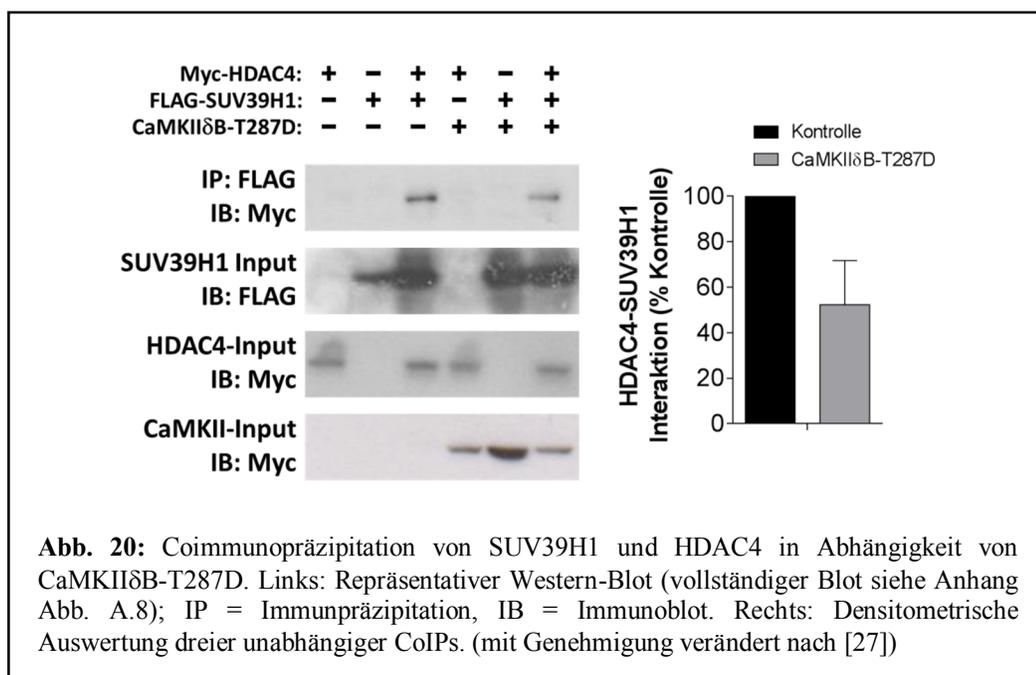
Neben einer vermehrten Entfernung der Methylierung von H3K9 könnte auch eine verringerte Setzung dieser repressiven Markierungen zu den beobachteten Veränderungen führen. Aus den vorangegangenen Versuchen in humanem Gewebe geht hervor, dass die beiden Histonmethyltransferasen G9A und SUV39H1 in ihrer Expression nicht verändert waren [27]. Allerdings konnte bereits 2002 gezeigt werden, dass SUV39H1 mit diversen HDACs physikalisch interagieren kann, um ein reprimiertes Stadium des entsprechenden Gens zu etablieren [84]. Entsprechend wäre eine Rolle von SUV39H1 auch im Falle der Repression des fetalen Genprogramms durch die Interaktion mit HDAC4 denkbar.

Kardiale Belastung führt zum Verlust der HDAC4-SUV39H1-Interaktion

Um eine mögliche Interaktion zwischen HDAC4 und SUV39H1 nachzuweisen, wurden zunächst Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Hierzu wurden *cos1*-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die für ein GFP-markiertes HDAC4 und eine FLAG-markiertes SUV39H1 codierten. Zur Simulation einer kardialen Belastung wurde zusätzlich bei der Hälfte der Ansätze eine konstitutiv aktive Form der CaMKII δ B (CaMKII δ B-T287D; mit Myc-Tag zur Detektion im Input) transfiziert, welche selektiv HDAC4 phosphoryliert und so dessen nukleären Export forciert [7]. Unter Kontrollbedingungen ohne Kinase konnten beide Enzyme im Nukleus nachgewiesen werden, wobei eine Colokalisation vorzuliegen schien (Abb. 19 A linke Reihe). Enthalten die Zellen zusätzlich CaMKII δ B-T287D, kam es zum Export von HDAC4 ins Cytosol mit einer punktuellen Verteilung, während SUV39H1 im Zellkern verblieb, dabei allerdings ebenfalls von einer homogenen Verteilung in eine mehr punktuelle Verteilung überging (Abbildung 19 A rechte Reihe).



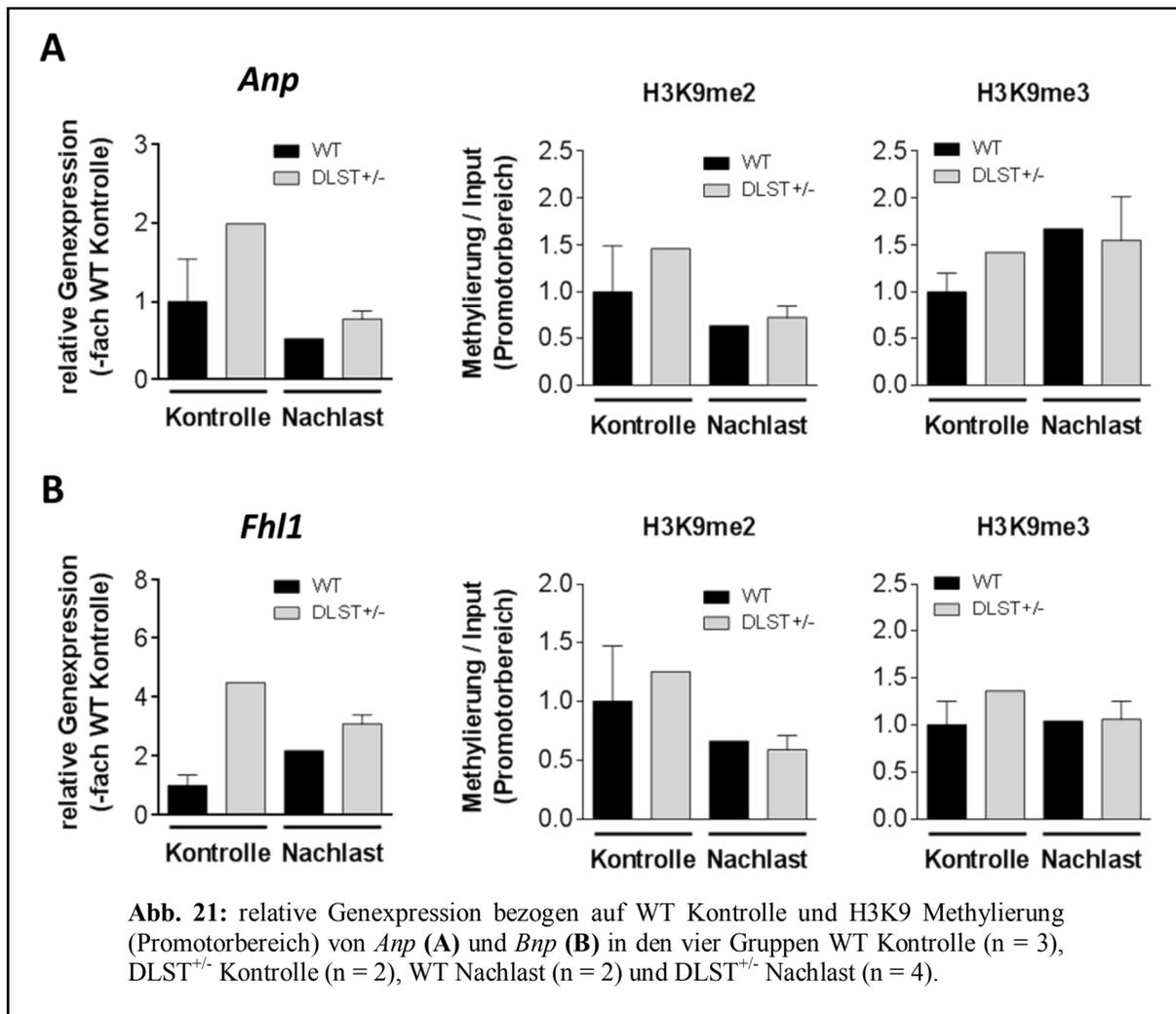
Bei der Berechnung der Verteilung von HDAC4 und SUV39H1 auf Zellkern und Cytosol wurden Zellen, bei denen keine eindeutige Zuordnung erfolgen konnte, da sowohl Signal im Kern, als auch im Cytosol vorlag, auch beiden Kompartimenten zugeordnet. Abbildung 19 B zeigt, dass sich HDAC4 unter Kontrollbedingungen überwiegend (ca. 60 %) und SUV39H1 fast ausschließlich (> 90 %) im Zellkern befand. Unter Einfluss von CaMKII δ B-T287D hingegen kam es zu einer signifikanten Verschiebung der Lokalisation von HDAC4 in das Cytosol (ca. 90 %) wohingegen die Lokalisation von SUV39H1 unverändert blieb. Diese Daten sprechen für eine direkte Interaktion zwischen HDAC4 und SUV39H1 innerhalb des Zellkerns. Um dies spezifischer nachzuweisen, wurden Coimmunopräzipitationen von HDAC4 und SUV39H1 durchgeführt. Hierzu wurden HEK293T-Zellen jeweils mit Myc-markiertem HDAC4 und FLAG-markiertem SUV39H1 transfiziert. Wie bei der Immunfluoreszenz wurde auch hier bei der Hälfte der Ansätze die konstitutiv aktive Kinase CaMKII δ B-T287D cotransfiziert. Mittels spezifischer Antikörper gegen die FLAG-Markierung wurde SUV39H1 aus den Zelllysaten gefällt und im Western-Blot nachgewiesen. Gleichzeitig wurde mit spezifischen Antikörpern gegen die Myc-Markierung auf eine mögliche direkte Interaktion mit HDAC4 getestet (Abb. 20).



Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, konnte eine direkte Interaktion von HDAC4 und SUV39H1 nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich, dass durch die Anwesenheit der konstitutiv aktiven CaMKII δ B-T287D diese Interaktion gestört wurde und auf etwa 50 % des Signals der Kontrollbedingung reduziert wurde.

Kein Einfluss von α KGDH auf H3K9-Methylierung

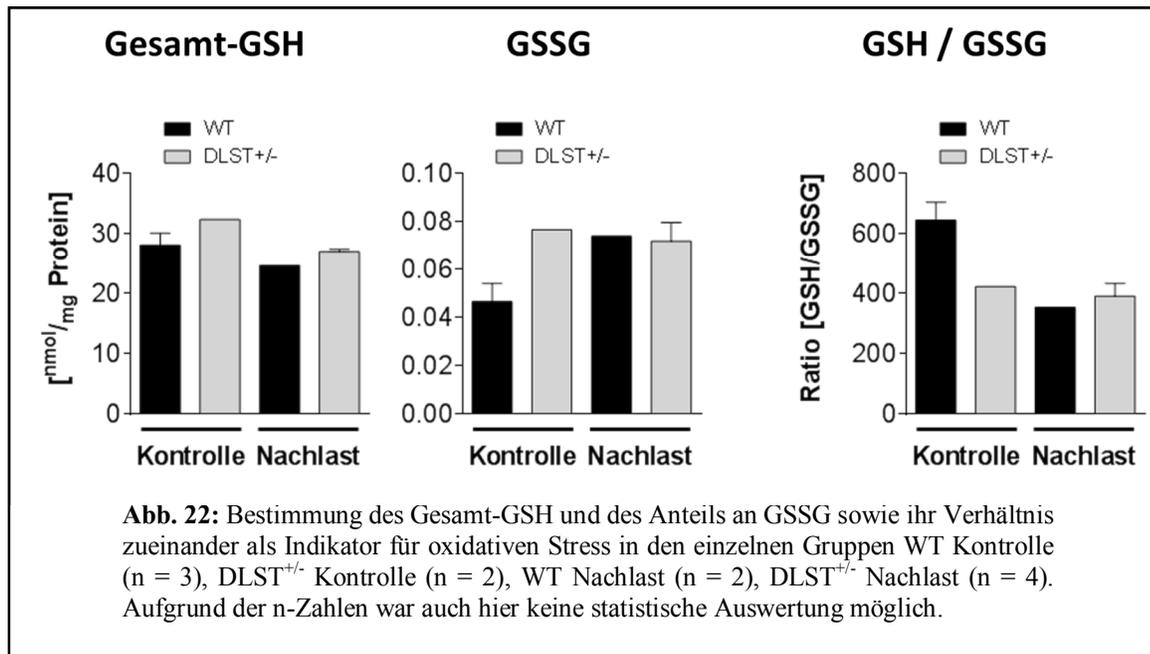
Wie in der Einleitung beschrieben ist die Reaktion der Demethylierung von H3K9 durch JMJD1A und JMJD2A unter anderem abhängig von α -Ketoglutarat. Im Jahr 2007 konnte die Forschergruppe um W. B. Dunn mittels Patientendaten eine erhöhte Konzentration von α KG im Serum von Patienten mit Herzinsuffizienz beobachten und als möglichen neuen Marker zur Diagnose dieser Krankheit identifizieren [18]. Durch eine Erhöhung des α KG-Spiegels könnte somit auch eine erhöhte Aktivität der beiden Histondemethylasen verbunden sein. Um dies zu testen, wurden erneut Working Heart Experimente an Mäuseherzen durchgeführt. Die verwendeten Mäuse besaßen dazu eine heterozygote Deletion der zweiten Untereinheit der α KGDH (DLST^{+/-}); als Kontrolle dienten entsprechende Wildtyp Mäuse aus dem gleichen Wurf. Bei beiden Mauslinien wurde das explantierte Herz in die Working Heart Apparatur eingebracht und entweder unter Kontrollbedingungen oder einer erhöhten Nachlast für 30 Minuten unterzogen (s. Material und Methoden). Aus einem Teil der so behandelten Herzen wurden zunächst RNA zur Überprüfung der Genexpression von *Anp* und *Fhl1* isoliert sowie ChIP-Assays in den entsprechenden Promotorbereichen für die Di- und Trimethylierung von H3K9 durchgeführt (Abbildung 21).



Im Fall von *Anp* kam es nach der Vorlasterrhöhung nicht wie erwartet zu einer gesteigerten, sondern einer eher abgeschwächten Expression in den WT Tieren. Ein ähnliches Bild zeigten auch die DLST^{+/-} Mäuse, die unter den Kontrollbedingungen allerdings bereits eine deutliche höhere *Anp*-Expression aufwiesen, als die WT Mäuse. Bei *Fhl1* zeigte sich ein etwas anderes Bild: während bei den WT Tieren die Expression durch die Vorlasterrhöhung anstieg, ging sie bei den DLST^{+/-} Tieren zurück, erneut mit einer deutlich höheren Expression bereits unter Kontrollbedingungen. Die entsprechenden ChIP-Daten zeigen fast keine Unterschiede zwischen den Genotypen oder der Behandlung und passen nur zum Teil zu den beobachteten Expressionsänderungen. Entsprechend scheint es in diesem Ansatz keine direkte Verbindung zwischen α KGDH-Aktivität, Genexpression und H3K9-Methylierung zu geben. Aufgrund der geringen Gruppengröße von WT Nachlast und DLST^{+/-} Kontrolle war eine statistische Auswertung nicht möglich.

In DLST^{+/-}-Herzen liegt basal vermehrt oxidiertes GSH vor verglichen mit WT Herzen

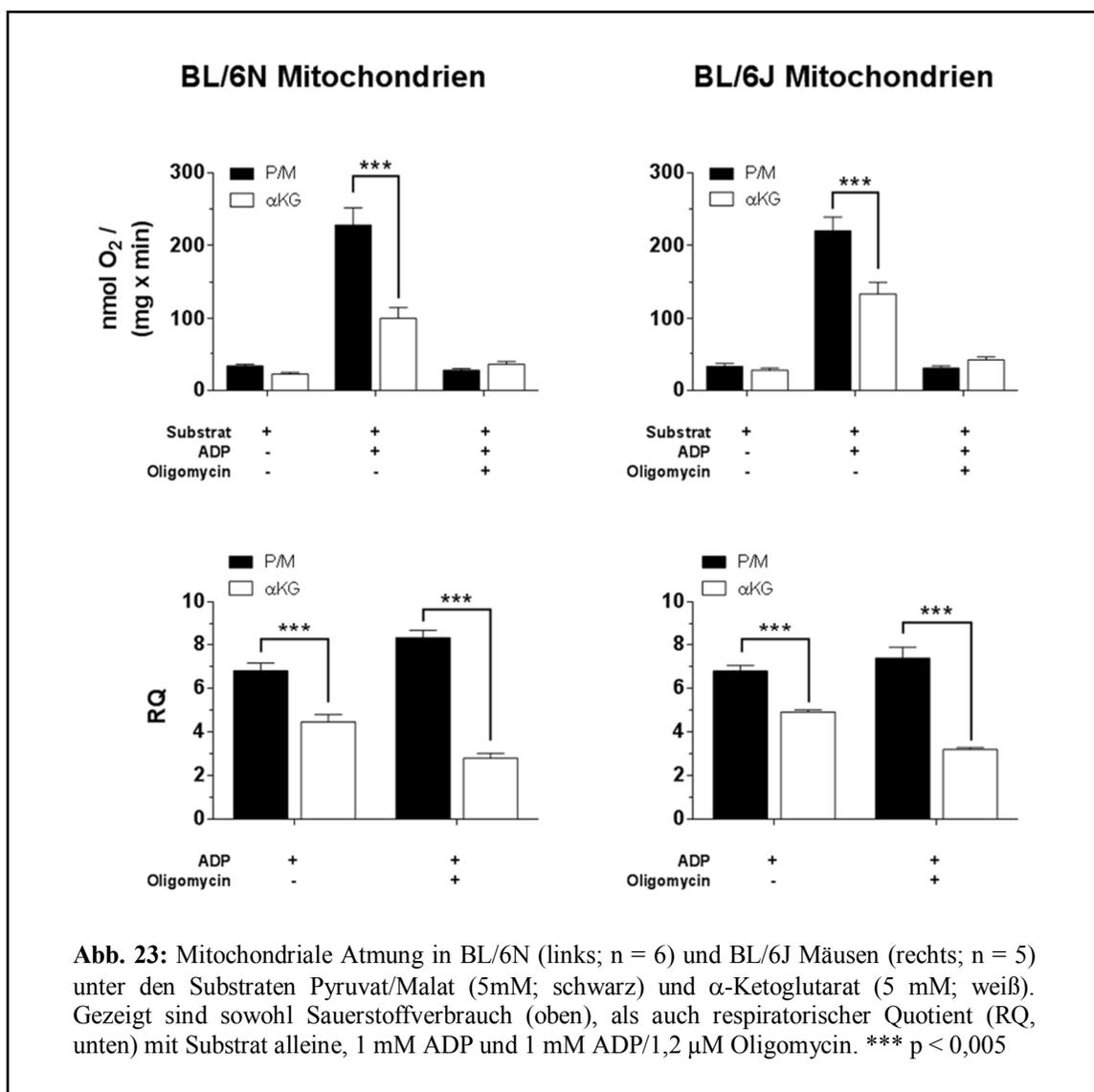
Neben der RNA und den ChIP-Analysen wurden die in der Working Heart behandelten Herzen auch zur Bestimmung des oxidativen Stresses verwendet. Hierzu wurde aus einem weiteren Teilstück Gesamtyolat isoliert, welches zur Bestimmung des Gesamt-GSH Gehaltes und des GSSG-Gehaltes verwendet wurde (Abbildung 22).



In der Menge des Gesamt-GSH unterschieden sich WT und DLST^{+/-} unwesentlich und in beiden Fällen ging die Menge an GSH auch nur unwesentlich durch die erhöhte Nachlast zurück. Im Gegensatz dazu besaßen die beiden DLST^{+/-} Tiere bereits unter Kontrollbedingungen einen fast doppelt so hohen GSSG-Spiegel, als die WT Tiere. Die Mengen an GSSG blieb in den DLST^{+/-} Tieren nach der Erhöhung der Nachlast relativ gleich, während sie in den WT Kontrollen entsprechend der Stressbedingung anstieg. Dies zeigt, dass die DLST^{+/-} Herzen mit der heterozygoten Deletion der αKGDH bereits unter Kontrollbedingungen tendenziell einen oxidierteren Redoxstatus besitzen, was ggf. Ausdruck für oxidativen Stress ist. Dieser Redoxstatus wird nicht weiter oxidiert, während die WT Herzen erst nach Nachlasterhöhung einen ähnlichen Redoxstatus entwickeln. Dies spiegelt sich auch in der Ratio von GSH zu GSSG wider und steht in gewisser Weise im Kontrast zu den Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen, dass die αKGDH an sich eine relevante Quelle für ROS sein könnte und somit einen wesentlichen Teil zum oxidativen Stress beitragen würde (s. Einleitung). Entsprechend sollte die Rolle der αKGDH für die Entstehung von oxidativem Stress direkt an isolierten Mitochondrien näher untersucht werden.

Unterschiedliche mitochondriale Atmung mit den Substraten α KG und P/M

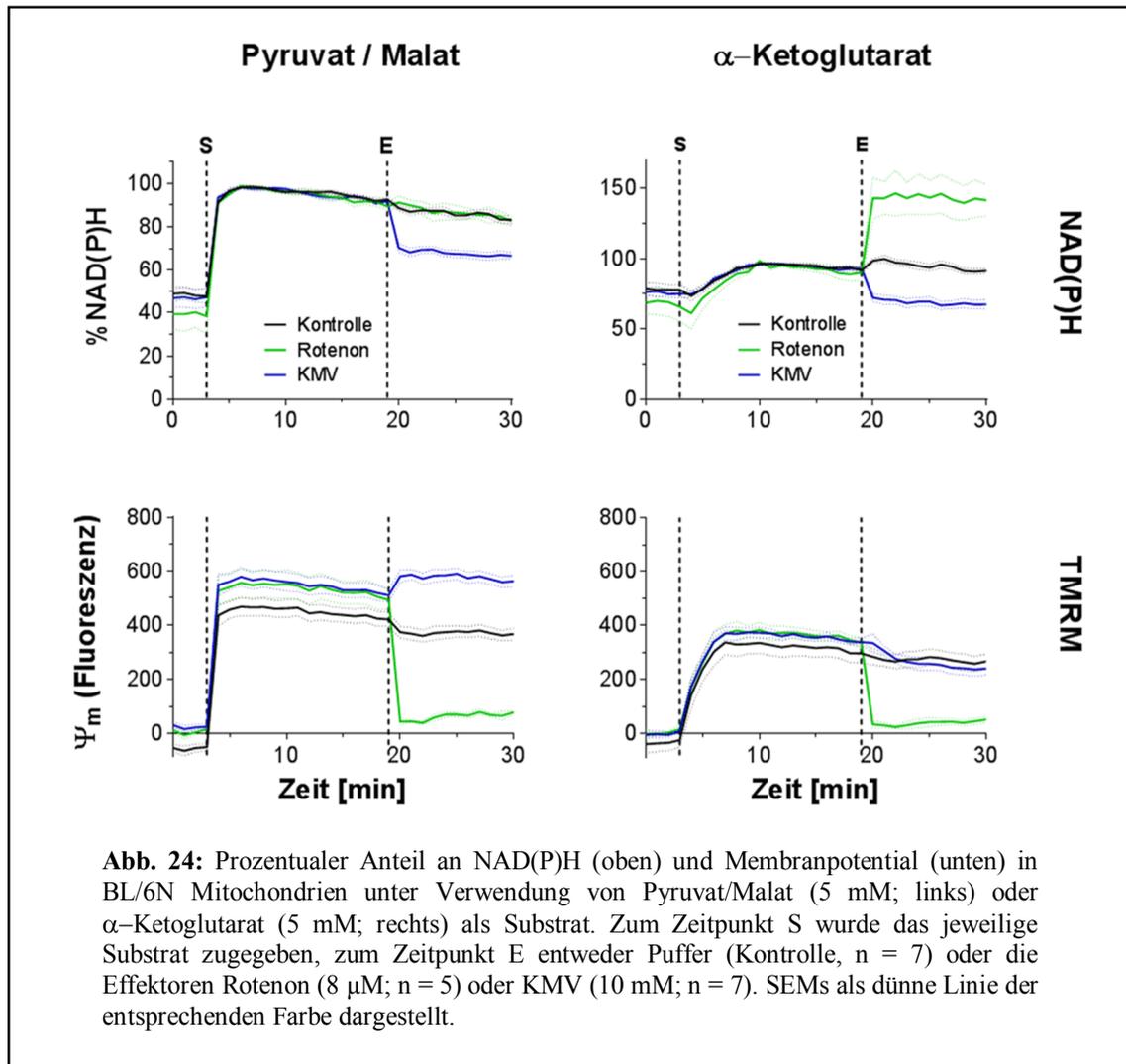
Um die Funktion der α KGDH zunächst unabhängig von einer möglichen Beeinflussung durch eine Deletion zu untersuchen, wurden Mitochondrien aus Herzen von Mäusen der Linie C57BL/6N isoliert. Zum Ausschluss oder Nachweis einer Beteiligung der NNT, welche eine wesentliche Rolle in der mitochondrialen ROS-Elimination und Produktion besitzt (s. Einleitung), wurden für alle folgenden Versuche entsprechend Mitochondrien aus den Herzen von C57BL/6J-Mäusen (nicht funktionelle NNT) isoliert. Mit diesen wurden zunächst Atmungsmessungen an einer Clark-Elektrode unter der Verwendung der Substrate Pyruvat/Malat oder α KG als direkter Eintritt an der α KGDH in den Citratzyklus (vgl. Abb. 7) durchgeführt. Die mitochondriale Atmung definiert sich dabei als Sauerstoffverbrauch pro Zeit und eingesetzter Menge an Mitochondrien, der respiratorische Quotient errechnet sich durch die Atmung unter ADP bzw. Oligomycin bezogen auf die Atmung unter Substrat alleine (Abb. 23).



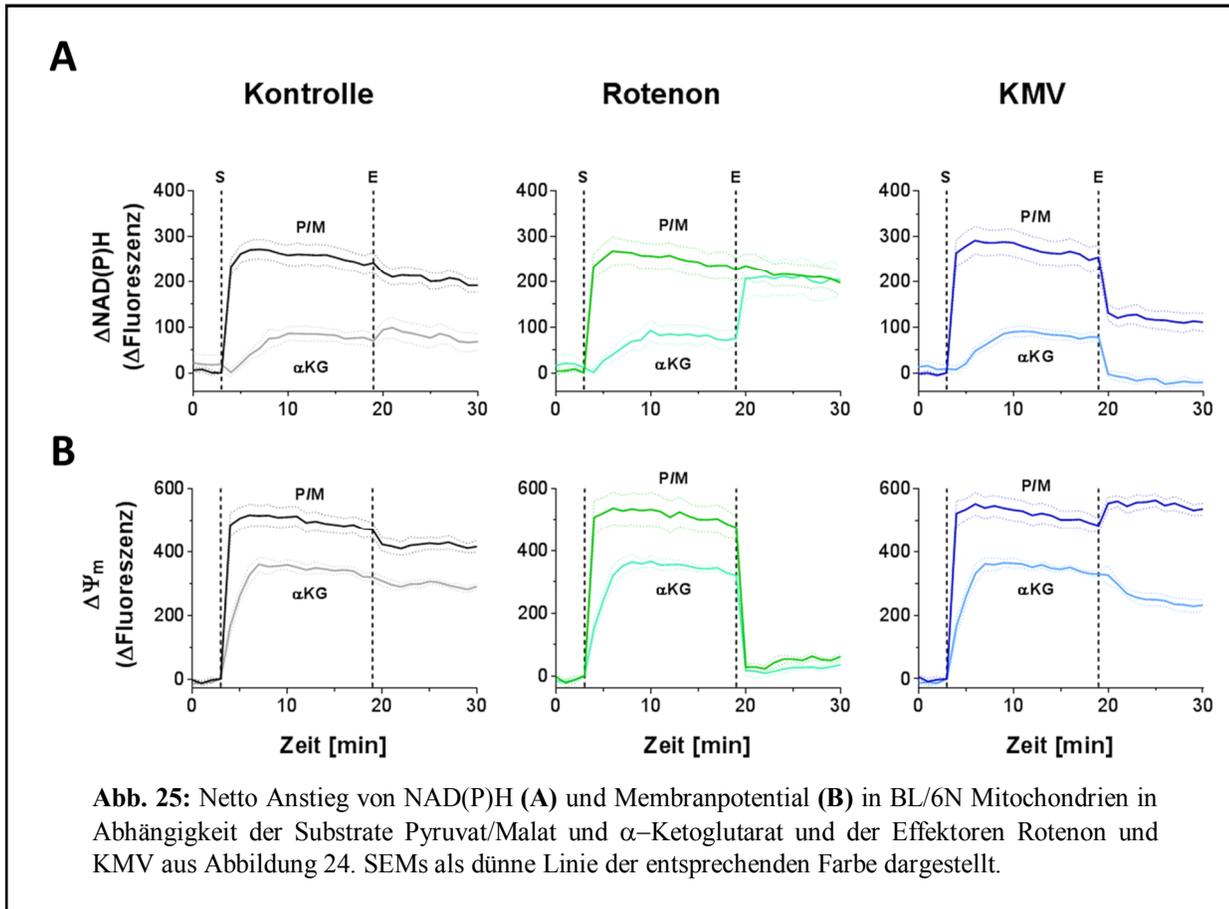
Sowohl in der state 2 (nur Substrat), als auch in der state 4 Atmung (Substrat, ADP und Oligomycin) ergaben sich keine Unterschiede zwischen P/M oder α KG als Substrat in beiden Mauslinien. Im Gegensatz dazu konnte eine deutlich schwächere state 3 Atmung (Substrat + ADP) in beiden Fällen festgestellt werden, wenn die Mitochondrien α KG statt P/M als Substrat nutzten. Dies spiegelte sich entsprechend auch in den signifikant unterschiedlichen respiratorischen Quotienten für beide Mauslinien wider. Des Weiteren scheint die state 3 Atmung in BL/6N Mitochondrien marginal niedriger zu sein, als in den BL/6J Mitochondrien.

NAD(P)H und $\Delta\Psi_m$ besitzen verschiedene Maxima abhängig vom Substrat

Um die Unterschiede in der mitochondrialen Atmung näher zu untersuchen, wurden wiederum in C57BL/6N und C57BL/6J Mitochondrien sowohl die NAD(P)H-Level, als auch das Membranpotential $\Delta\Psi_m$ unter Einfluss der beiden Substrate P/M und α KG bestimmt. Die Messungen erfolgten nach einem zeitlichen Protokoll, bei dem 15 Minuten nach Substratzugabe (Plateauphase) zusätzlich entweder die Atmungskette an Komplex I mittels Rotenon blockiert oder die α KGDH mittels des spezifischen Inhibitors KMV gehemmt wurde. Die Menge an einzusetzendem Inhibitor wurde zuvor an isolierten Mitochondrien mittels Aktivitätsmessung bestimmt (s. Anhang Abb. A.2) und auf 10 mM festgesetzt. Der prozentuale Anteil an NAD(P)H wurde durch die empirische Festsetzung des Maximums in der Plateauphase auf 100 % und des Minimums nach Zugabe von Oligomycin/DNP (in den Diagrammen nicht berücksichtigt) auf 0 % berechnet. Da sich die Ergebnisse für BL/6N und BL/6J Mitochondrien nicht maßgeblich unterschieden, sind zur besseren Übersicht im Folgenden ausschließlich die Ergebnisse für die BL/6N Mitochondrien aufgeführt (Abb. 24). Die entsprechenden Graphen für BL/6J Mitochondrien sind dem Anhang zu entnehmen (Abb. A.3 und A.4).



Bereits in Abbildung 24 wird deutlich, dass Mitochondrien, die α KG als Substrat verwendeten, eine andere Dynamik im Aufbau der NAD(P)H-Level und des mitochondrialen Membranpotentials besaßen, als Mitochondrien, die P/M verwendeten. Um diese Unterschiede etwas deutlicher hervorzuheben wurden die jeweiligen Anstiege bezogen auf den niedrigsten Wert vor Substratzugabe berechnet (Deltas der Anstiege). Die Ergebnisse sind in nachfolgender Abbildung 25 zusammengefasst.



Vergleicht man NAD(P)H-Level und Membranpotential unter Verwendung von P/M oder α KG lässt sich feststellen, dass in beiden Fällen das Plateau nach Substratzugabe unter α KG um etwa zwei Drittel (NAD(P)H) bzw. ein Drittel (TMRM) niedriger liegt als unter P/M. Des Weiteren wurde dieses Plateau für beide Parameter auch etwas langsamer erreicht. Durch die Blockierung der Atmungskette mittels Rotenon veränderte sich das Signal für NAD(P)H unter P/M nicht, wohingegen unter α KG eine Maximierung auf das Level von P/M erfolgte. Unter beiden Substraten kam es dabei wie erwartet zur vollständigen Dissipation des Membranpotentials. Im Gegensatz dazu führte eine Inhibition der α KGDH bei Verwendung beider Substrate zu einer Halbierung (P/M) bzw. zum vollständigen Verlust (α KG) des zuvor gebildeten NAD(P)H. Interessanterweise kam es hierdurch nicht wie erwartet zu einer Erniedrigung des Membranpotentials, sondern in beiden Fällen wurde dieses mehr oder weniger konstant gehalten bzw. unter P/M sogar nochmals leicht erhöht. Diese Daten ergeben die Vermutung, dass das NADH aus der von der α KGDH katalysierten Reaktion scheinbar sowohl erst mit Verzögerung und nur zu einem bestimmten Maß für die Atmungskette zur Energiegewinnung zur Verfügung gestellt wird. Da in diesem Fall auch weniger Elektronen durch die Atmungskette geschleust werden, sollte sich das auf die Produktion von ROS auswirken.

α KGDH ist wichtig für die Regeneration der antioxidativen Kapazität via NNT

Um die Rolle der α KGDH für die mitochondriale ROS-Produktion zu untersuchen, wurde zunächst erneut in BL/6N und BL/6J Mitochondrien die Gesamtmenge an H_2O_2 -Emission mittels Amplex UltraRed bestimmt. Das Messprotokoll wurde in Anlehnung an die kinetischen Messungen von NAD(P)H und $\Delta\Psi_m$ so gewählt, dass die Effektorzugabe innerhalb der Plateauphase für NAD(P)H und Membranpotential (= 15 Minuten nach Substratzugabe) erfolgte. Anhand einer Eichmessung für Amplex UltraRed (s. Anhang Abb. A.5) konnte die Menge an gebildetem H_2O_2 bezogen auf die eingesetzte Menge an Mitochondrien berechnet werden. Da sich für die mitochondriale H_2O_2 -Produktion zumindest unter einem der Substrate Unterschiede ergaben, sind im Folgenden die Ergebnisse für beide Mauslinien aufgeführt (Abb. 26).

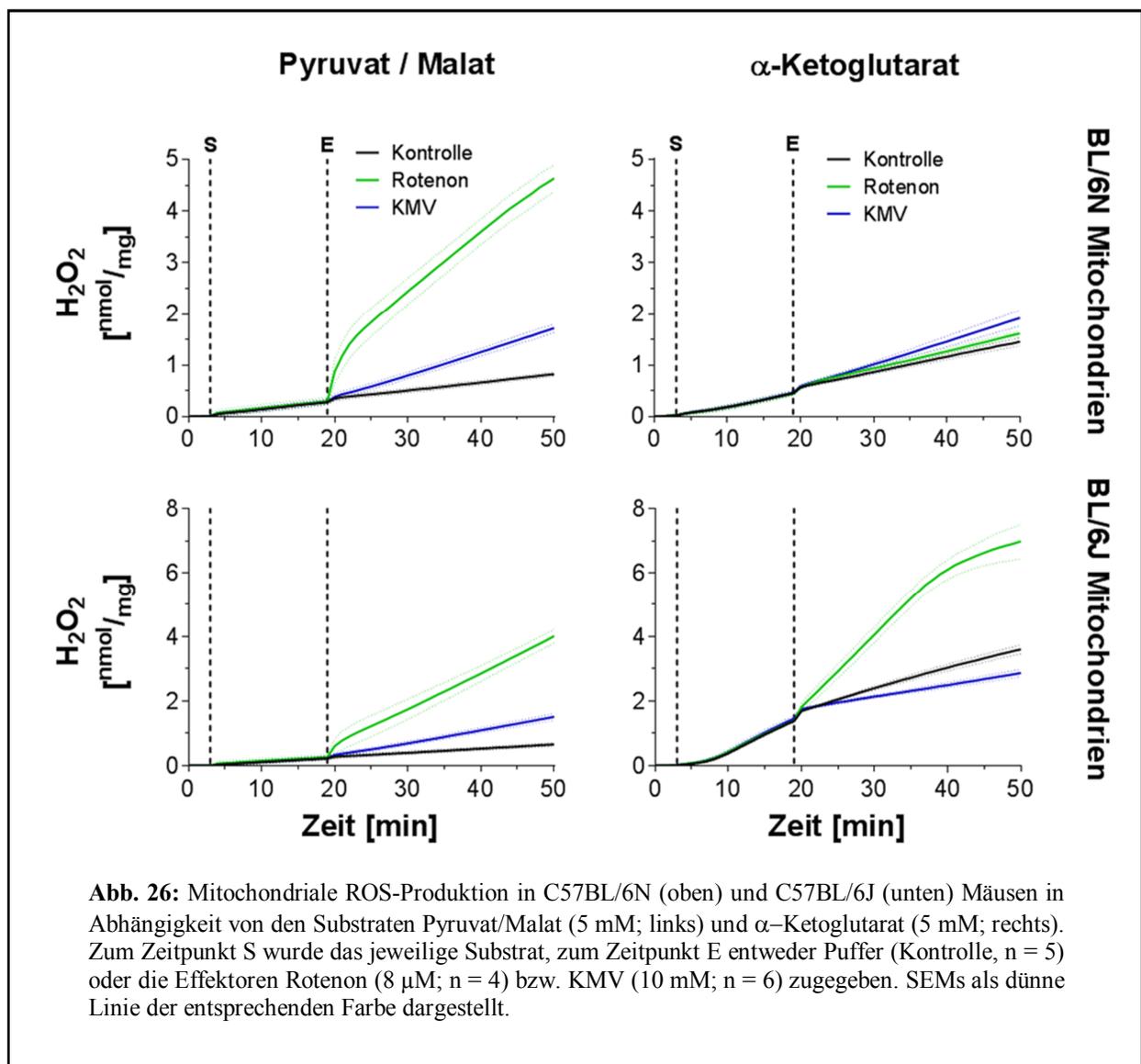
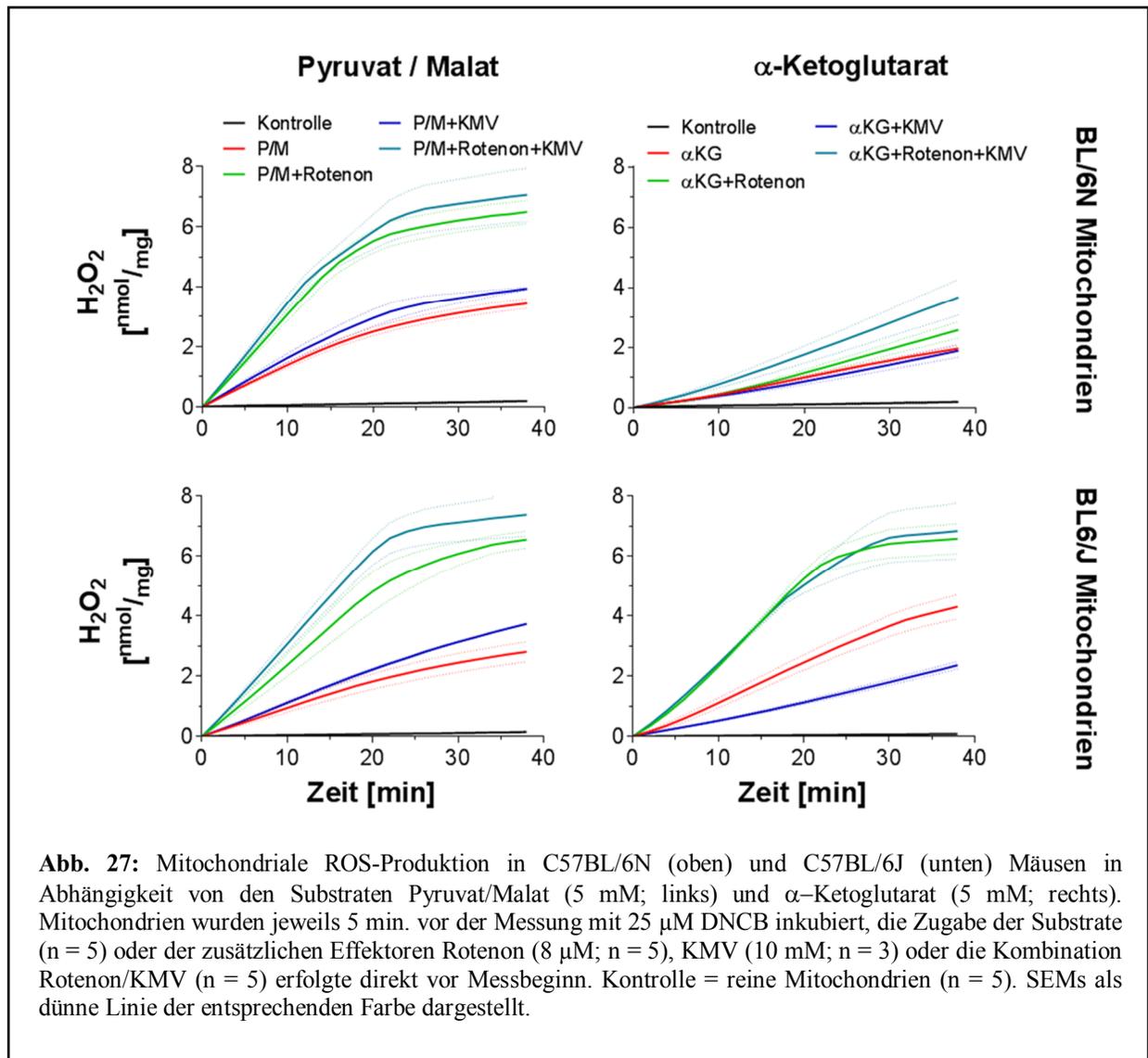


Abb. 26: Mitochondriale ROS-Produktion in C57BL/6N (oben) und C57BL/6J (unten) Mäusen in Abhängigkeit von den Substraten Pyruvat/Malat (5 mM; links) und α -Ketoglutarat (5 mM; rechts). Zum Zeitpunkt S wurde das jeweilige Substrat, zum Zeitpunkt E entweder Puffer (Kontrolle, n = 5) oder die Effektoren Rotenon (8 μ M; n = 4) bzw. KMV (10 mM; n = 6) zugegeben. SEMs als dünne Linie der entsprechenden Farbe dargestellt.

Unter Verwendung von P/M als Substrat zeigten sich zunächst keine Unterschiede zwischen den beiden Mauslinien (Cave: unterschiedliche Y-Achsen). Durch die Zugabe von Rotenon erfolgte wie erwartet ein massiver Anstieg der mitochondrialen H_2O_2 -Emission im Vergleich zur Kontrolle. Durch die Inhibition der α KGDH zeigte sich interessanterweise ebenfalls eine maßgebliche Zunahme der ROS-Produktion, was darauf hindeutet, dass dieses Enzym eher an der Entgiftung von H_2O_2 (wahrscheinlich über NADPH Regeneration) beteiligt, als eine relevante Quelle für ROS an sich ist. Im Gegensatz dazu konnten unter Verwendung von α KG deutliche Unterschiede sowohl zwischen BL/6N und BL/6J Mitochondrien, als auch gegenüber P/M als Substrat beobachtet werden. In N-Mäusen kam es nach der Zugabe von Rotenon zu keiner Veränderung der ROS-Produktion, obwohl zu diesem Zeitpunkt die Konzentration an NAD(P)H und damit auch die Wahrscheinlichkeit zur Bildung von ROS maximiert war. Auch die Inhibierung der α KGDH führte zu einem deutlich geringeren Anstieg der H_2O_2 -Produktion verglichen mit den Messungen unter P/M. Ein völlig anderes Bild zeigte sich hingegen in BL/6J Mitochondrien. Diese entwickelten unter α KG bereits vor Zugabe der Effektoren eine deutlich höhere Menge ROS als in den drei anderen Versuchsanordnungen. Wurde dann die Atmungskette mittels Rotenon blockiert, kam es wie unter P/M zu einem massiven Anstieg der ROS-Produktion. Die Inhibition der α KGDH hingegen führte hier tatsächlich zu einer Abnahme der ROS-Produktion. Da ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Mauslinien der Defekt in der NNT darstellt (s. Einleitung 4.2), könnten diese Daten darauf hindeuten, dass die α KGDH zur Regeneration der antioxidativen Kapazität von der NNT abhängig ist. Um dies zu testen, wurden erneut Messungen der ROS-Produktion in Mitochondrien beider Mauslinien durchgeführt, welche zuvor mit dem Stoff DNCB behandelt wurden. Dieser führt durch die Alkylierung zur Depletion von GSH und damit zur Einschränkung der antioxidativen Kapazität [5] (Abb. 27).



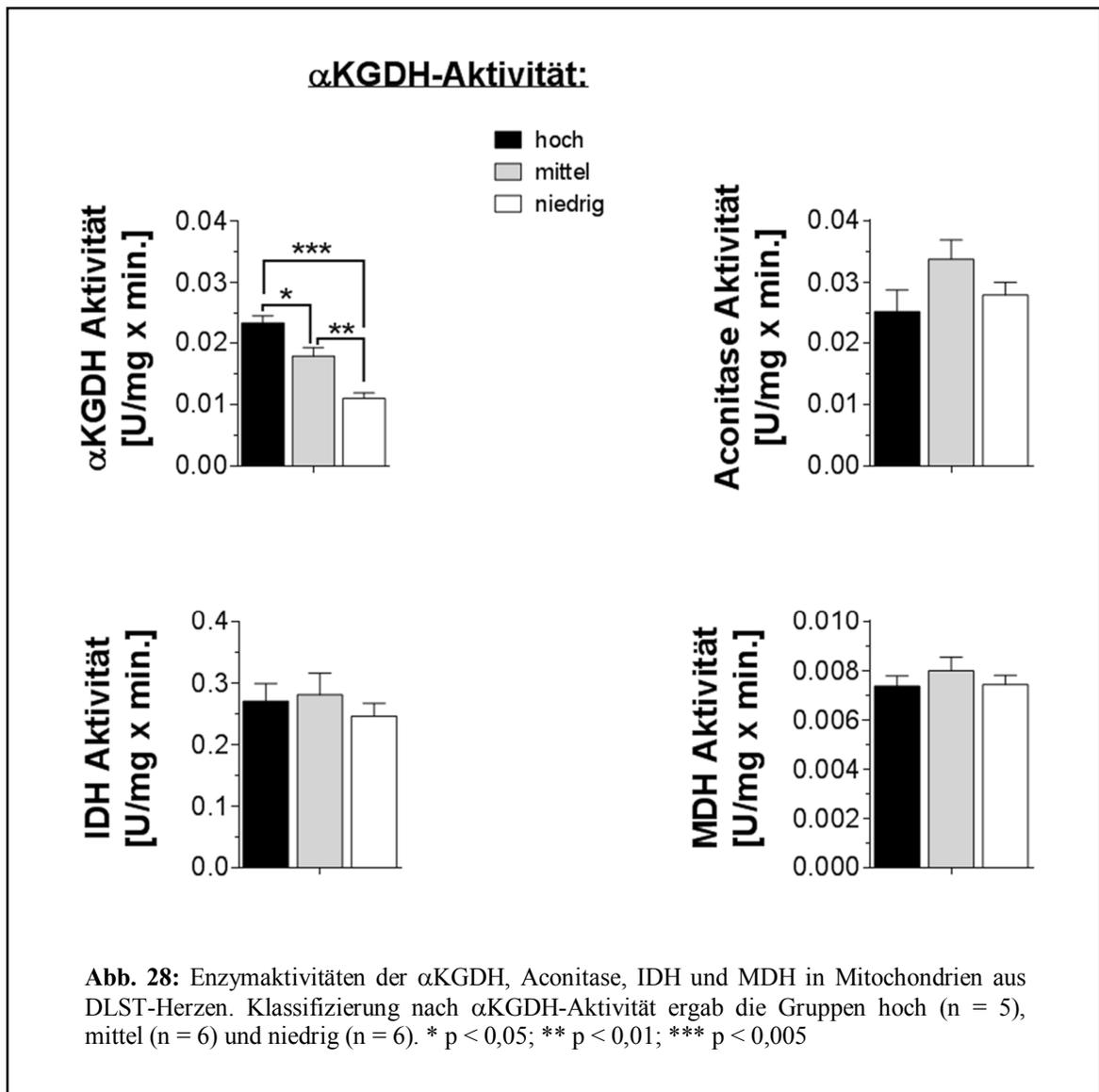
Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, kam es unter P/M auf Grund der fehlenden antioxidativen Kapazität bereits nur durch Zugabe des Substrates zu einer starken ROS-Entwicklung in beiden Mauslinien. Diese wurde durch die Blockierung der Atmungskette durch Rotenon noch weiter gesteigert, während die Inhibition der α KGDH weder alleine noch in Kombination mit Rotenon für eine zusätzliche Erhöhung des mitochondrialen H_2O_2 führte. Im Gegensatz dazu erfolgte in BL/6N Mitochondrien, die α KG als Substrat verwendeten, nach Substratzugabe eine geringere Steigerung der ROS-Produktion trotz depletierter antioxidativer Kapazität. Des Weiteren kam es durch die Blockierung der Atmungskette nur zu einer geringen Erhöhung der H_2O_2 -Bildung, während die Inhibition der α KGDH keinen Effekt zeigte. Erst durch die kombinierte Anwendung von α KGDH-Inhibition und Blockierung der Atmungskette konnte eine deutlich gesteigerte ROS-Produktion beobachtet werden. In BL/6J Mitochondrien zeigte sich hingegen unter α KG ein ähnliches Bild wie unter P/M mit deutlich erhöhter ROS-Entwicklung bereits nur durch Substratzugabe. Diese wurde

wiederum durch die Zugabe von Rotenon noch weiter erhöht, während es durch die Inhibition der α KGDH hier erneut zu einer Abschwächung der H_2O_2 -Produktion kommt. Die Kombination von Rotenon und KMV ergab auch hier keinen weiteren Effekt. Zusammengenommen sprechen diese Ergebnisse dafür, dass die α KGDH in Abhängigkeit von der NNT das von ihr gebildete NADH hauptsächlich in die antioxidative Kapazität überführt. Erst durch ein Fehlen der NNT kommt es zur Oxidation des NADHs an der Atmungskette, weshalb sich die Inhibition der α KGDH in N-Mäusen negativ, in J-Mäusen allerdings positiv auswirkt. Um diese These weiter zu unterstützen, wurden aus der

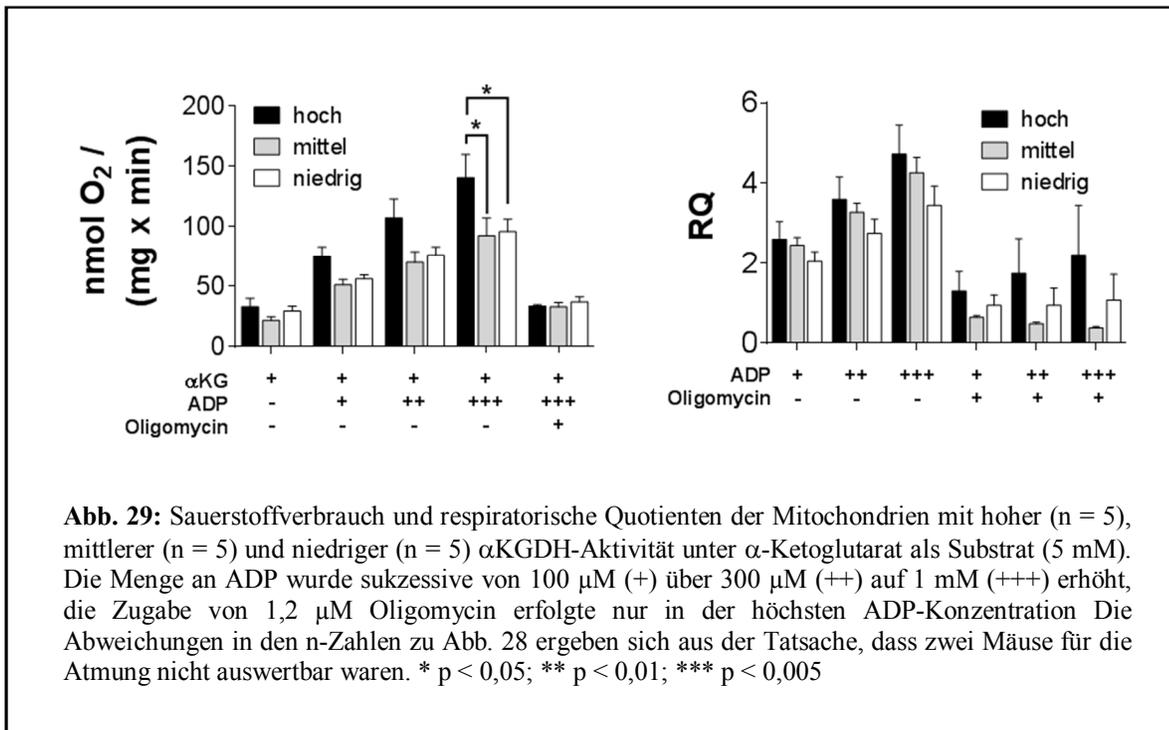
DLST^{+/-}-Mauslinie ebenfalls Mitochondrien isoliert und die Enzymaktivitäten verschiedener Citratzyklusenzyme sowie mitochondriale Atmung und ROS-Produktion untersucht.

Verminderte α KGDH-Aktivität verringert mitochondrialen O_2 -Verbrauch und erhöht ROS-Emission

Die Isolation der Mitochondrien erfolgte auf Grund des Versuchaufbaus aus dem verdauten Restherz, welches zur Isolation der Einzelkardiomyozyten verwendet wurde (s. unten und Material und Methoden). Die Untersuchung der Enzymaktivität wurde für die folgenden vier Citratzyklusenzyme durchgeführt: Isocitrat Dehydrogenase (IDH), Aconitase, α KGDH und Malat Dehydrogenase (MDH). Die α KGDH-Aktivität korrelierte dabei in den meisten Fällen mit dem entsprechenden Genotyp, allerdings wiesen auch einige Mäuse eine Abweichung auf, d.h. manche WT Mitochondrien zeigten eine erniedrigte α KGDH-Aktivität, während manche Mitochondrien aus DLST^{+/-}-Herzen eine erhöhte Aktivität aufwiesen. Entsprechend wurden alle Tiere unabhängig von ihrem Genotyp anhand der experimentell ermittelten α KGDH-Aktivität in drei Tertile aufgeteilt (niedrige, mittelstarke und hohe Aktivität) und die nachfolgenden Ergebnisse aus mitochondrialen und zellulären Experimenten gemäß dieser drei Gruppen aufgeteilt (Abb. 28).

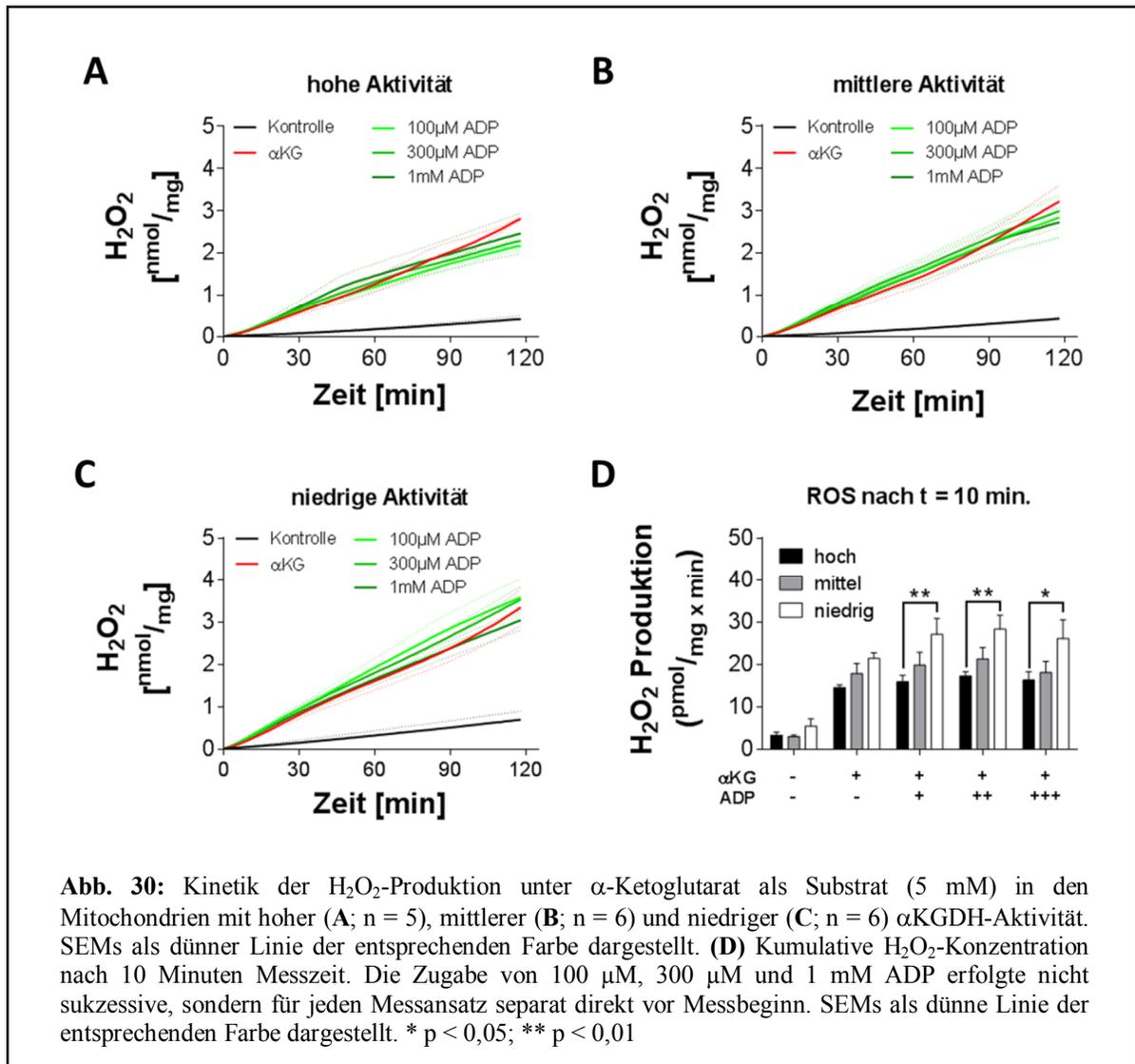


Durch den Aktivitätsverlust in der α KGDH wurden die Aktivitäten der anderen Enzyme nicht beeinträchtigt. Lediglich für die Aconitase konnte eine Tendenz zu einer Gegenregulation in Mitochondrien mit mittlerer Aktivität beobachtet werden. Um festzustellen, ob sich der Flux durch den Citratzyklus verändert, wurde die mitochondriale Atmung untersucht. Auf Grund des niedrigen Probevolumens (Enzymaktivität, Atmung und H_2O_2 -Messungen erfolgten aus dem gleichen Herzen) konnte hier nur die Atmung unter dem Substrat α KG gemessen werden (Abb. 29).



Vergleicht man die mitochondriale Atmung innerhalb der drei Gruppen, so lässt sich feststellen, dass die Mitochondrien mit mittlerer und niedriger α KGDH-Aktivität in der state 3 Atmung ab einer ADP-Konzentration von 300 μ M einen signifikant niedrigeren Sauerstoffverbrauch besitzen. Im state 2 (nur Substrat) lässt sich nur eine Tendenz zu einem niedrigeren Sauerstoffverbrauch feststellen, im state 4 (mit Oligomycin) zeigten sich keine Unterschiede. Entsprechend ergibt sich für die respiratorischen Quotienten eine Tendenz in Richtung einer erniedrigten Atmung unter α KG in Mitochondrien mit funktionell eingeschränkter α KGDH.

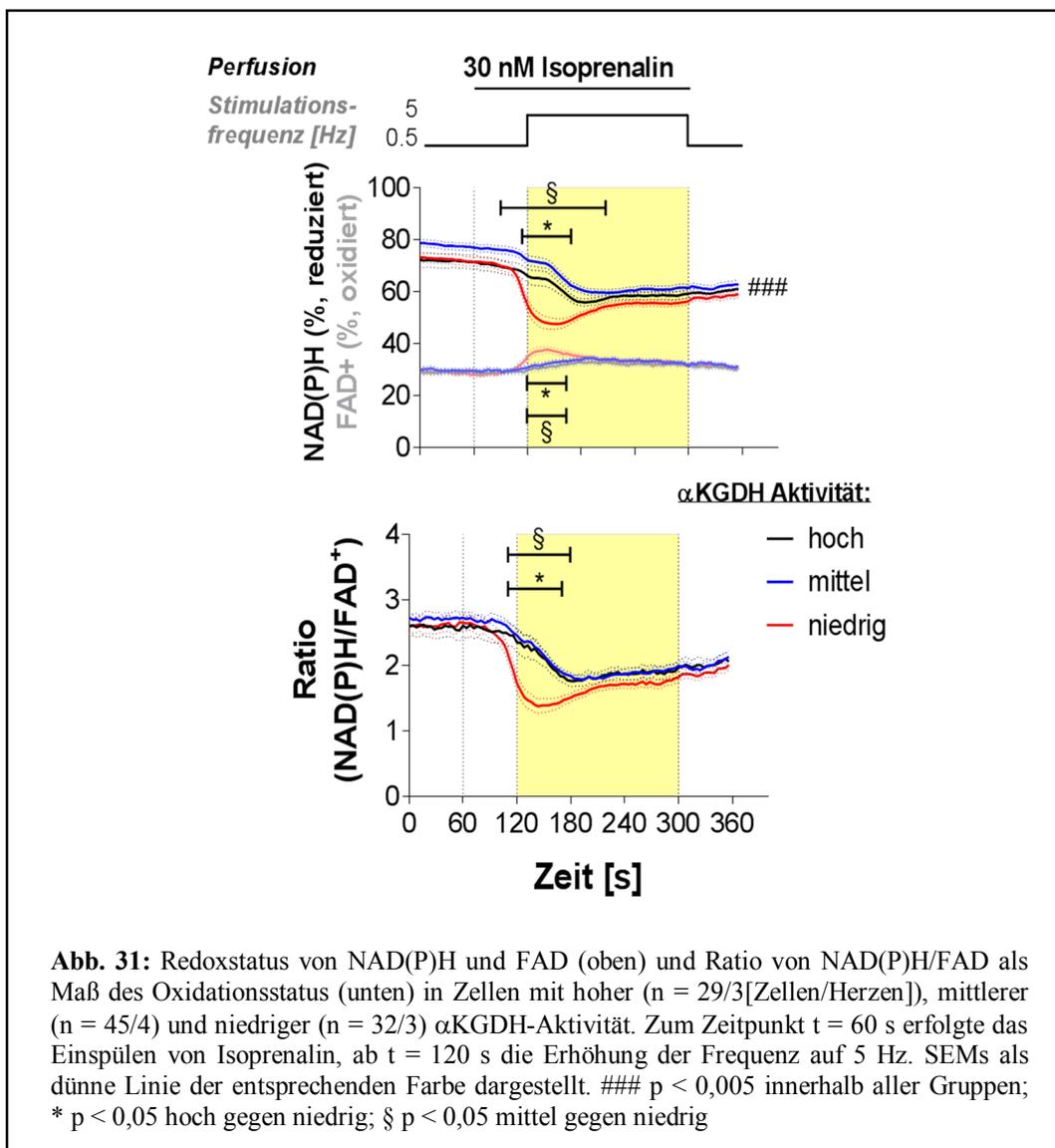
Um die Auswirkung der α KGDH-Aktivität auf die mitochondriale ROS-Produktion zu untersuchen, wurden – unter den gleichen Bedingungen wie bei den Atmungsmessungen – Amplex UltraRed Messungen zur Bestimmung des gesamt H₂O₂ durchgeführt (Abb. 30).



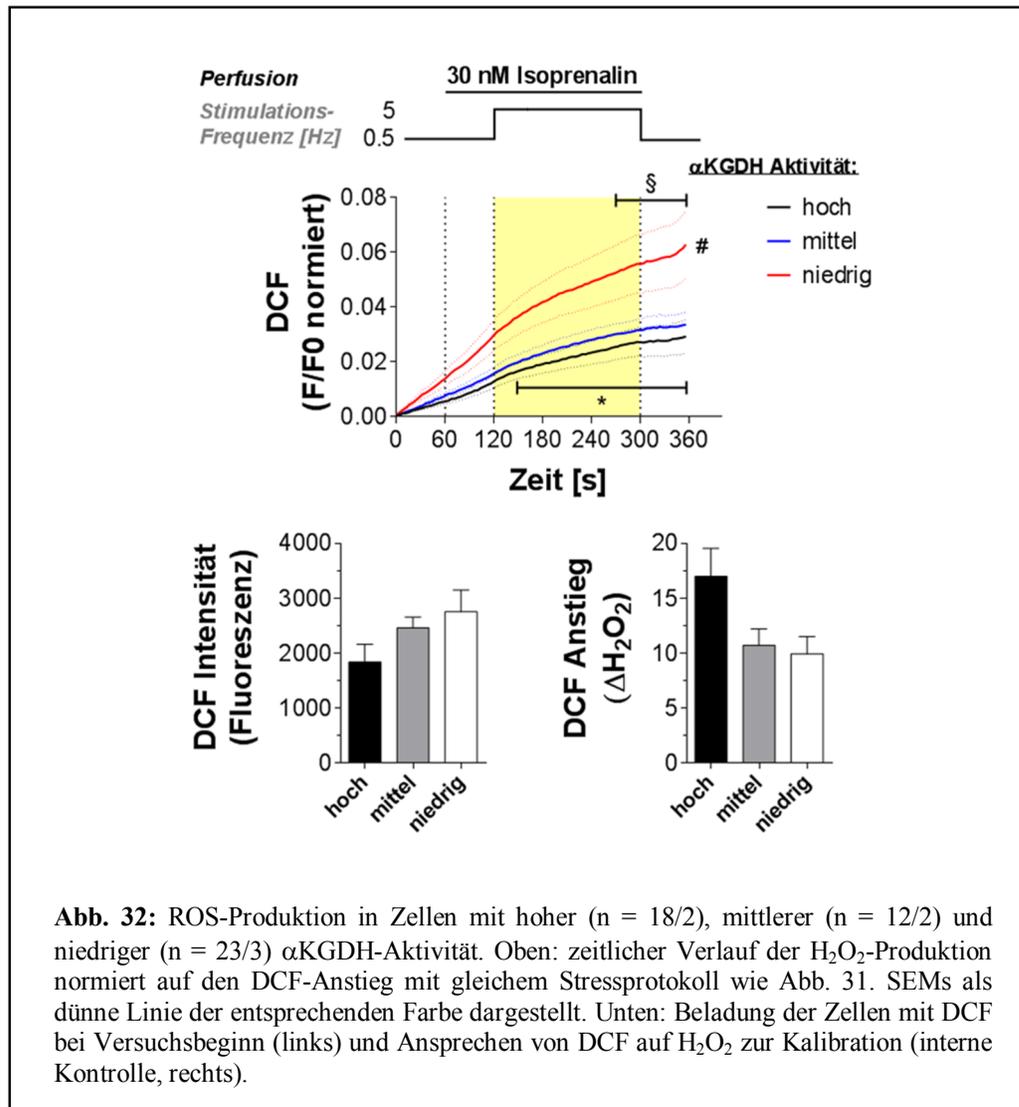
Wie aus Abbildung 30 hervorgeht, kam es auch bei der mitochondrialen ROS-Emission zu Unterschieden zwischen den einzelnen Gruppen. Während mit Substrat allein nur eine Tendenz zu einer gesteigerten H_2O_2 -Entwicklung in Mitochondrien mit mittlerer und niedriger α KGDH-Aktivität zu beobachten ist, kommt es zumindest in Mitochondrien mit niedriger Aktivität zu einer signifikant erhöhten ROS-Produktion in Anwesenheit von ADP im Vergleich zu Mitochondrien mit hoher Aktivität (Abb. 30 D). In Verbindung mit den Ergebnissen aus den Atmungsmessungen kann die bisher aufgestellte These weiter unterstützt und um folgenden Punkt erweitert werden: die α KGDH ist nicht nur ein wichtiges Enzym zur Elimination von mitochondrialen ROS, sondern kontrolliert durch den Flux des Citratzyklus scheinbar auch deren Entstehung. Um dies nun in einem größeren physiologischeren Kontext zu überprüfen, wurde aus den DLST-Herzen auch Kardiomyozyten isoliert und diese in einem Stressprotokoll an einer IonOptix Zellverkürzungsanlage hinsichtlich des mitochondrialen Redoxstatus sowie der zellulären ROS-Produktion untersucht.

Redoxstatus und ROS-Produktion sind abhängig von α KGDH-Aktivität in Kardiomyozyten

Die Herzen von WT und DLST^{+/-} Mäusen, welche später zur Isolation von Mitochondrien dienten, wurden zuvor zur Isolation von Kardiomyozyten mittels Langendorff-Perfusion eingesetzt. In den so gewonnenen Zellen wurde in der Zellverkürzungsanlage zunächst der zelluläre Redoxstatus von NAD(P)H und FAD sowie die Kontraktilität der einzelnen Zellen in einem definierten Stressprotokoll untersucht (vgl. Material und Methoden). Entsprechend den Ergebnissen in Mitochondrien wurden auch hier alle gewonnenen Daten nicht nach Genotyp, sondern gemäß der jeweils gemessenen α KGDH-Aktivität zusammengefasst (Abb. 31).



In Zellen mit hoher oder mittlerer α KGDH-Aktivität zeigte sich ein typischer Verlauf des Redoxstatus von NAD(P)H und FAD, bei dem nach Erhöhung der Arbeitslast (β -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin und gleichzeitige Erhöhung der Schlagfrequenz auf 5 Hz) eine leichte Oxidation stattfindet. Diese vollzieht im weiteren Verlauf eine geringe Erholung, erreicht aber nicht mehr den Ausgangswert. Im Gegensatz dazu kam es in Zellen mit einer niedrigen α KGDH-Aktivität zu einem signifikanten Einbruch des Redoxstatus bereits alleine durch die β -adrenerge Stimulation. Auch in diesen Zellen kommt es unter 5 Hz zu einer geringen Erholung, bei der ebenfalls das Ausgangsniveau nicht erreicht wird und auch die Anpassung an die beiden anderen Gruppen erst nach Ende des Stressprotokolls erfolgt. Dieser massive Einbruch im Redoxstatus ist dabei nicht mit einer geringeren Arbeitslast verbunden, da in keinem Parameter der Kontraktilität Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden (s. Anhang Abb. A.6). Um zu überprüfen, ob der signifikante Einbruch des Redoxstatus in Zellen mit niedriger α KGDH-Aktivität Auswirkung auf die zelluläre ROS-Produktion besitzt, erfolgten mit weiteren Zellen Messungen des zellulären H_2O_2 unter dem gleichen Stressprotokoll (Abb. 32). Das DCF-Signal wurde dabei über die interne Kontrolle (Zugabe von 10 mM H_2O_2 , s. Material und Methoden) für jeden Messpunkt normiert.



Aus Abbildung 32 geht hervor, dass in Zellen mit hoher und mittlerer αKGDH-Aktivität – wie bereits für den Redoxstatus beobachtet – keine Unterschiede in der zellulären H₂O₂-Produktion zu beobachten waren. Im Gegensatz dazu kam es in Zellen mit niedriger αKGDH-Aktivität zu einer signifikanten Zunahme der ROS-Produktion. Dementsprechend konnte auch im zellulären Modell die These bestätigt werden, dass die αKGDH eine zentrale Rolle insbesondere für die Elimination von ROS spielt, während kein Hinweis darauf gefunden wurde, dass unter physiologischen Bedingungen die αKGDH eine relevante Quelle für ROS darstellt.

IV. DISKUSSION

Jmjd-Histondemethylasen als Feinregulatoren

In vorangegangenen Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnten wir zum ersten Mal den Zusammenhang zwischen Histonmodifikationen und der Reaktivierung von Genen – in diesem Fall *ANP* und *BNP* – zeigen, welche während des kardialen Remodelings in Herzinsuffizienzpatienten aktiviert werden [20, 37, 74]. Zu unserer Überraschung konnten wir zwar in den kranken Herzen einen massiven nukleären Export der Histondeacetylase HDAC4, aber nur marginale Veränderungen in der Acetylierung verschiedener Histonpositionen der Promotorregionen von *ANP* und *BNP* feststellen. Vielmehr kam es zu einer stabilen Demethylierung von H3K9 bei einem gleichzeitigen Verlust der Bindung von HP1, so dass der reprimierte Zustand der beiden Gene zu Gunsten einer aktiven Form des Chromatins aufgehoben wird [27]. Ein möglicher Mechanismus dabei deutete sich durch die gesteigerte Expression der beiden Histondemethylasen JMJD1A und JMJD2A an, welche spezifisch die Demethylierung von H3K9 katalysieren [62]. Durch den Vergleich von neonatalen und adulten Rattenkardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass die Expression sowohl von *Anp* und *Bnp*, als auch der beiden Demethylasen *Jmjd1a* und *Jmjd2a* in den neonatalen Zellen deutlich erhöht war. Wie bei den humanen Daten ging diese Expressionserhöhung mit einer Demethylierung von H3K9 in den entsprechenden Promotorbereichen einher, so dass eine direkte Rolle dieser beiden Enzyme für die Reaktivierung des fetalen Genprogramms angenommen werden kann. Dies steht auch im Konsens mit Ergebnissen aus glatten Muskelzellen, bei denen die Aktivierung von *Jmjd1a* zu einer globalen Demethylierung von H3K9 und entsprechend einer Aktivierung verschiedener zellspezifischer Gene führte [47].

Des Weiteren scheint die Funktion von *Jmjd1a* und *Jmjd2a* in dem angewandten Modellsystem der neonatalen Rattenkardiomyozyten redundant zu sein, da sich die Genexpression von *Anp* und *Bnp* nicht verändert, wenn nur eine der beiden Demethylasen durch siRNAs herabreguliert ist. Vielmehr kommt es durch diesen Einzelknockdown zur erhöhten Expression der jeweils anderen Demethylasen, was für eine kompensatorische Anpassung spricht. Entsprechend konnte erst durch einen parallelen Knockdown beider Histondemethylasen in neonatalen Rattenkardiomyozyten eine stabile Herabregulation beider Enzyme herbeigeführt werden. Damit einhergehend waren eine Remethylierung von H3K9 im Promotorbereich von *Anp* und *Bnp* sowie eine entsprechende Herabregulierung dieser beiden Gene. Dies unterstreicht eine direkte Rolle der *Jmjd*-Demethylasen bei der Reaktivierung fetaler Gene und damit auch der Entstehung der Herzinsuffizienz. Tatsächlich konnte die Arbeitsgruppe von Zhang und Kollegen zeigen, dass *Jmjd2a* durch die Regulierung des Gens *Fhl1* Anteil am kardialen Remodeling hat. *FHL1* ist Teil der Mechanotransduktion im Herzen und kann kardiale Hypertrophie via SRF und Myokardin auslösen. Entsprechend zeigte sich in

ihrem Mausmodell nach einer Aortenkonstriktion ein milderer Phänotyp der Hypertrophie in Mäusen mit einem *Jmjd2a*-Knockout, aber ein schwererer Phänotyp wenn *Jmjd2a* überexprimiert wurde [94].

Dennoch gibt es mehrere Punkte, die dafür sprechen, dass die beiden Jmjd-Demethylasen nur eine modulierende Rolle spielen: 1. In der Studie von Zhang und Kollegen kam es in neonatalen Rattenkardiomyozyten trotz eines Knockdown von *Jmjd2a* um ca. 80 % nur zu einer Herabregulierung von *Fhl1*, nicht aber *Anp* unter basalen Bedingungen [94]. 2. Auch im vorliegenden Modell der neonatalen Rattenkardiomyozyten konnte nach doppeltem Jmjd-Knockdown nur eine schwache Reduzierung der Expression von *Anp*, *Bnp* und *Fhl1* beobachtet werden, wobei man beachten muss, dass auch die Effizienz des DKD nur bei ca. 20 % (*Jmjd1a*) bzw. 50 % (*Jmjd2a*) lag (s. Abb. 18 A). 3. In vorangegangenen Versuchen konnten wir in einem Working Heart Modell an Mäusen zeigen, dass eine Aktivierung von *Anp* und *Bnp* bereits sehr früh als Antwort auf einen hämodynamischen Stress erfolgt. Dieser Expressionsanstieg ist wiederum mit der Demethylierung von H3K9 im Promotorbereich der beiden Gene verbunden. Eine Expressionsänderung der Histondemethylasen *Jmjd1a* und *Jmjd2a* wie in den humanen Proben blieb hier allerdings aus. Allerdings konnten wir auch dort einen massiven Export von HDAC4 aus dem Nukleus beobachten und auch Versuche an HDAC4-Knockout Mäusen zeigten, dass ein Fehlen von HDAC4 eine wichtige regulatorische Rolle für die Methylierung von H3K9 spielt [27]. Die Tatsache, dass HDACs auch Histonmethylierung beeinflussen können wurde schon in früheren Studien beobachtet. So zeigte die Gruppe um Zoya Marinova in neuronalen Zellen, dass die Methylierung von H3K4 durch die Blockierung der zellulären HDACs mittels verschiedener HDAC-Inhibitoren im Promotorbereich von *Hsp70* ansteigt [50]. Umgekehrt kam es in Versuchen von Sailaja und Kollegen in Mäusen, die einem Stressprotokoll unterzogen wurden, zunächst zu einem Anstieg der Methylierung von H3K9 im Promotorbereich des Gens *mPlc*. Gleichzeitig waren sowohl die Expression, als auch die Rekrutierung von HDAC4 in den Promotorbereich von *mPlc* erhöht. Wurden die Mäuse allerdings mit HDAC-Inhibitoren behandelt, wurde HDAC4 nicht im Promotorbereich nachgewiesen und die Hypermethylierung von H3K9 blieb aus [73]. Es scheint also mindestens einen Mechanismus zu geben, der für die Kontrolle von H3K9-Methylierung durch HDAC4 verantwortlich ist.

Reaktivierung fetaler Gene durch Verlust der HDAC4-SUV39H1-Interaktion

Ein Enzym, welches ebenfalls die Methylierung von H3K9 beeinflusst, ist die für diesen Histonrest spezifische Methyltransferase SUV39H1, welche durch das Setzen dieser Markierung gleichzeitig eine Plattform für die Bindung von HP1 bildet und so einen inaktiven Chromatinzustand etabliert [8, 41, 70]. Allerdings konnten wir in vorangegangenen Versuchen in den humanen Proben keine wesentliche Änderung der Expression von *SUV39H1* feststellen, jedoch ist bekannt, dass SUV39H1 unter anderem sowohl mit verschiedenen Histondeacetylasen, als auch HP1 auf Proteinebene interagieren kann [84, 93]. Durch die Versuche in *cos1*-Zellen konnte zunächst gezeigt werden, dass auch HDAC4 hinsichtlich des Kompartiments mit SUV39H1 colokalisiert und dass diese Colokalisation durch die Anwesenheit der konstitutiv aktiven Proteinkinase CaMKII δ B-T287D aufgehoben wird. Weiterführend wurde mit entsprechenden CoIP Experimenten eine direkte Interaktion zwischen HDAC4 und SUV39H1 nachgewiesen, welche ebenfalls durch die Aktivität der CaMKII δ B-T287D aufgehoben wird (vgl. Abb. 19 und 20). Es wurde bereits gezeigt, dass CaMKII eine erhöhte Aktivität in insuffizienten Herzen besitzt und kausal an der Ausprägung einer Hypertrophie auf Grund einer erhöhten Arbeitslast am Herzen beteiligt ist [6, 35]. Des Weiteren bindet sie selektiv an HDAC4, wodurch diese an definierten Serinresten phosphoryliert wird. Dies führt wiederum dazu, dass HDAC4 aus dem Nukleus exportiert und ein Reimport inhibiert wird [7], so dass sich dadurch ein möglicher Mechanismus postulieren lässt, bei dem HDAC4 und SUV39H1 als Proteinkomplex im Zellkern vorliegen und SUV39H1 über die MEF2-Bindestelle von HDAC4 an die Promotorregion von Zielgenen rekrutiert wird (Abb. 33).

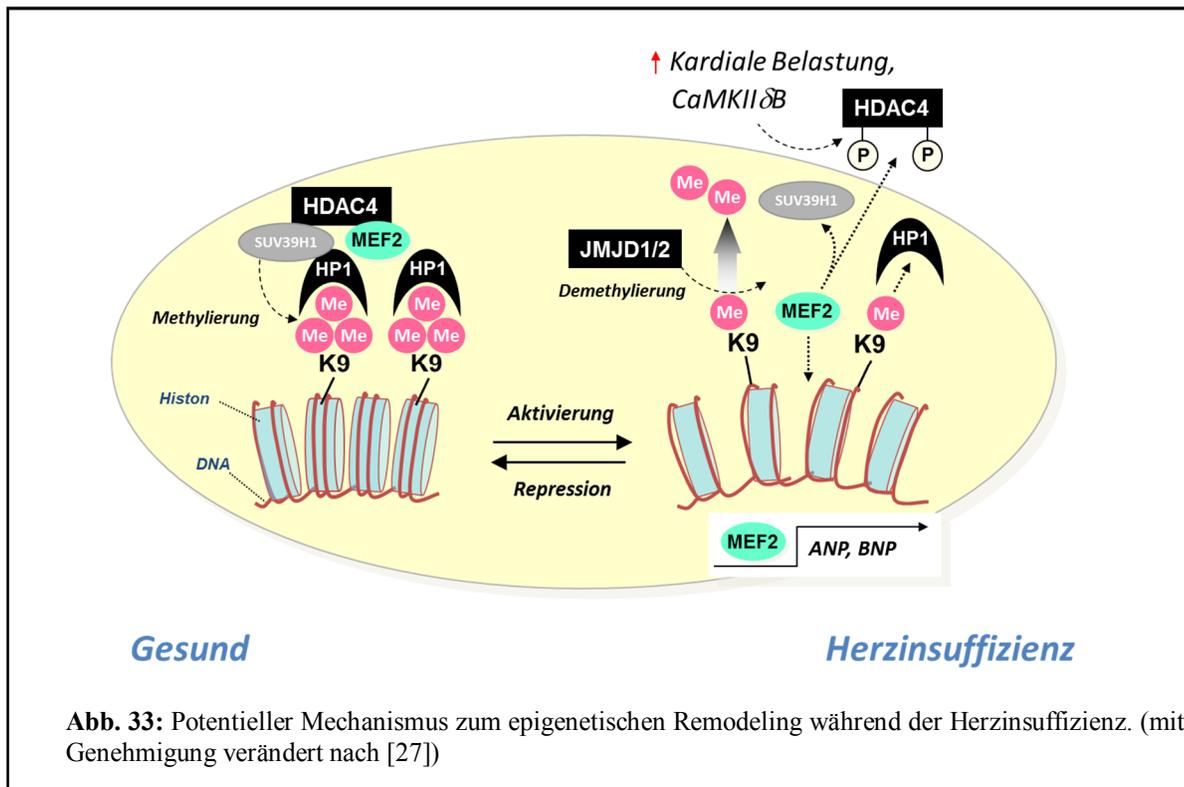


Abb. 33: Potentieller Mechanismus zum epigenetischen Remodeling während der Herzinsuffizienz. (mit Genehmigung verändert nach [27])

Durch Deacetylierungs- und Methylierungsfunktion im Zusammenspiel mit der Bindung von HP1 wird ein heterochromatischer und damit inaktiver Zustand etabliert. Beim kardialen Remodeling kommt es durch Erhöhung der hämodynamischen Last zu einer Aktivierung der CaMKII, welche ihrerseits HDAC4 phosphoryliert. Dies führt zum nukleären Export von HDAC4 und gleichzeitig zur Auflösung der Interaktion mit SUV39H1. Ohne Rekrutierung von SUV39H1 kann die Methylierung und damit der inaktive Zustand nicht weiter aufrechterhalten werden und es kommt zur Reexpression der fetalen Gene. Unterstützende oder modulierende Funktion besitzen dabei die Histondemethylasen JMJD1A und JMJD2A, welche am nun „freien“ Promotorbereich wirken können und wahrscheinlich erst in einem fortgeschrittenen Stadium der Herzinsuffizienz vermehrt exprimiert werden um den offenen Chromatinstatus zu stabilisieren.

Auch wenn diese Daten keine direkte Kausalität zwischen Belastung, epigenetischen Veränderungen und Ausprägung der Herzinsuffizienz liefern, konnte ein plausibler Mechanismus entwickelt werden, wie das Zusammenspiel zwischen HDAC4-Export, Histondemethylierung und Reaktivierung fetaler Gene funktionieren könnte. Des Weiteren ergibt sich hieraus auch eine Erklärung für die beobachteten Änderungen in der Verteilung beider Enzyme im Zellkern. Nachdem HDAC4 und SUV39H1 unter Kontrollbedingungen weitestgehend homogen im Zellkern vorliegen, ergibt sich nach dem nukleären Export von HDAC4 ein mehr punktuell Muster für SUV39H1 (und auch HDAC4; vgl. Abb. 19 A). Dies könnte daher kommen, dass SUV39H1 – nun nicht mehr durch HDAC4 an definierte Stellen rekrutiert – vermehrt an andere repressive

Enzymkomplexe bindet und dadurch an bestimmten Stellen im Nukleus akkumuliert. Für die entsprechende Expression ergäbe sich keine wesentliche Änderung, da diese Bereiche bereits zuvor in einem inaktiven Zustand gehalten wurden.

Jmjd-Aktivität unabhängig von α KGDH-Aktivität

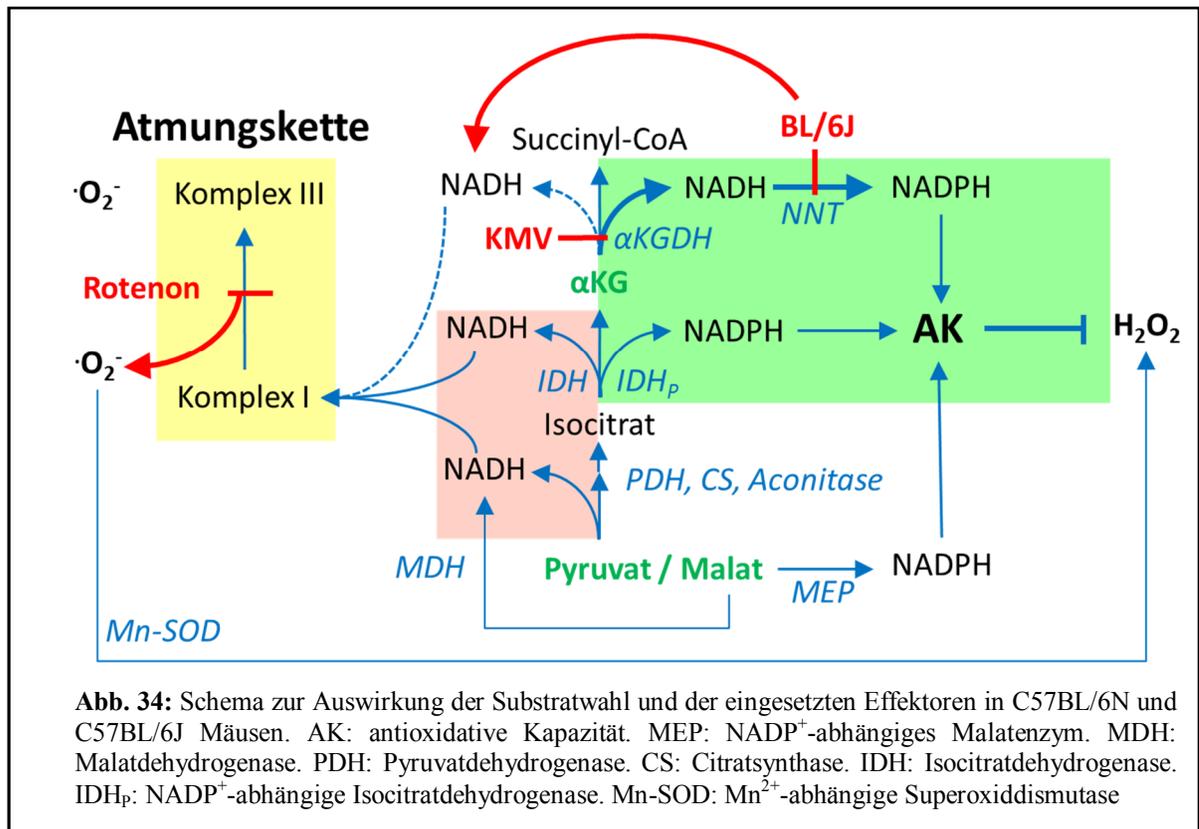
Wie bereits oben erwähnt, geht das entwickelte Modell davon aus, dass die Demethylierung von H3K9 durch die Jmjd-Demethylasen erst dann erfolgen kann, wenn die räumlichen Bedingungen – also die Dissoziation des repressiven Komplexes aus HDAC4/SUV39H1/HP1 – gegeben sind. Eine weitere Möglichkeit bestünde auch in einer Aktivitätserhöhung der beiden Enzyme unabhängig von ihrer Expression. JMJD1A und JMJD2A gehören zu einer vielfältigen Familie von Demethylasen, die gemeinsam als Cosubstrate Fe^{2+} -Ionen und α -Ketoglutarat benutzen [62]. Man könnte daher annehmen, dass bei einer erhöhten Konzentration an α KG auch die Aktivität dieser Enzyme mit ansteigt. Die Versuche in Mäusen mit einer heterozygoten Deletion der zweiten Untereinheit der α KGDH zeigten, dass sich die Expression der fetalen Gene zwischen WT und DLST^{+/-} Mäusen weder basal noch nach Erhöhung der Nachlast wesentlich unterscheiden. Zudem reagierten die WT Tiere in der Expression von *Anp* nicht mit einer Aktivierung nach Erhöhung der Nachlast, sondern tendenziell eher mit einer Erniedrigung. Auch die Methylierung von H3K9 scheint sich weder durch Genotyp, noch durch die Behandlung maßgeblich zu unterscheiden (Abb. 21). Dies steht im Kontrast zu den in vorangegangenen Versuchen von uns beobachteten Expressionserhöhungen von *Anp* in CD1 Mäusen nach Vor- oder Nachlasterhöhung einhergehend mit einer stabilen Demethylierung von H3K9 in dessen Promotorbereich. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre der genetische Hintergrund, der sich zwischen beiden Mauslinien unterscheidet und damit durchaus Einfluss auf die Reaktion der Herzen in der Working Heart mit sich bringen könnte. Allerdings muss in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen werden, dass auf Grund der Diskrepanz zwischen Genotyp und α KGDH-Aktivität bei den restlichen Versuchen eine Einteilung mit der Grundlage der gemessenen Enzymaktivität herangezogen wurde (vgl. Abb. 28). Dies war in den Versuchen zu Genexpression und Histonmethylierung nicht möglich, so dass hier unter Umständen die Einteilung nach Genotyp nicht die wirkliche Enzymaktivität widerspiegelt. Entsprechend würde dies zu den nicht erwarteten Beobachtungen sowohl in WT, als auch DLST^{+/-} Mäusen führen. Da sich allerdings im gemessenen GSSG unter basalen Bedingungen bereits ein vermehrter oxidativer Stress in den DLST^{+/-} Mäusen abhängig von Genotyp zeigt (vgl. Abb. 22), kann nicht exakt belegt werden, ob in diesen Versuchen ebenfalls Genotyp und α KGDH-Aktivität voneinander abweichen. Daher muss zunächst davon ausgegangen werden, dass die

α KGDH-Aktivität – und damit eine mögliche Akkumulation von α KG – bei der Reaktivierung des fetalen Genprogramms für die Aktivität der Jmjd-Demethylasen keine Rolle spielt.

Gründe, warum bei den weiteren Versuchen die gemessene Enzymaktivität nicht vollständig mit dem Genotyp der Mäuse korrelierte sind schwer zu ermitteln. Die gleichbleibende Aktivität der anderen Citratzyklusenzyme sprechen dafür, dass diese Unterschiede nicht auf eine unreine Präparation zurückzuführen sind. Auch die Qualität der Mitochondrien ist eher auszuschließen, da Atmung und respiratorischer Quotient eine reine Mitochondrienpopulation vermuten lassen. Des Weiteren wurden alle Tiere aufgrund dieser Beobachtung erneut genotypisiert um eine falsche Übernahme der Daten aus Leuven auszuschließen. Aufgrund des globalen Knock-outs wurde die Genotypisierung mittels aus einem Ohrstück isolierter DNA durchgeführt, so dass eine Möglichkeit wäre, dass sich während der Zucht aus einem globalen ein organspezifischer Knock-out entwickelt hat, der genotypisch entsprechend WT anzeigt, phänotypisch aber zu DLST^{+/-} tendiert.

α KGDH wichtiger Faktor zur Entgiftung von ROS

Die Produktion von ROS in Mitochondrien ist direkt mit der Progression verschiedener altersbedingter neurodegenerativer Erkrankungen verbunden [45]. Aber auch für die Ausbildung des kardialen Remodelings während der fortschreitenden Herzinsuffizienz durch eine erhöhte Druckbelastung konnte bereits bewiesen werden, dass oxidativer Stress eine maßgebliche Rolle spielt [14, 52]. In vorangegangenen Versuchen konnte unsere Gruppe zeigen, dass der Redoxstatus von NADH und NAD(P)H sowie die Regeneration von NAD(P)H elementar für die Entgiftung von ROS ist [65]. Die Beobachtung mehrerer Arbeitsgruppen, dass auch die α KGDH möglicherweise eine wichtige Quelle für die Bildung von ROS darstellt [2, 69] steht dabei im Kontrast zu unseren Ergebnissen in DLST^{+/-} Mäusen, die unter basalen Bedingungen bereits einen erhöhten oxidativen Stress besitzen, so dass die α KGDH eher essenziell für die Entgiftung von ROS ist. Durch die vorliegenden Versuche ergibt sich, dass das von der α KGDH gebildete NADH überwiegend zur Regeneration der antioxidativen Kapazität und weniger zur Energiegewinnung an der Atmungskette herangezogen wird. Dies zeigt sich bereits durch die unterschiedliche state 3 Atmung in Mitochondrien aus Herzen von C57BL/6N (und auch C57BL/6J) Mäusen. Unter Verwendung von α KG als Substrat – und damit der α KGDH als Eintrittsstelle für den Citratzyklus – liegt die state 3 Atmung um ca. 60 % niedriger als bei P/M, welches via Pyruvatdehydrogenase über den Weg des Acetyl-CoA in den Citratzyklus eintritt (vgl. Abb. 7 und 34).



Diese erniedrigte Atmung unter α KG konnte auch in C57BL/6N Mitochondrien beobachtet werden, die – wie auch die Mitochondrien der DLST Tiere – aus durch die Langendorff-Perfusion verdauten Herzen isoliert wurden (s. Anhang Abb. A.7). Durch den zuvor stattgefundenen Verdau scheint die Verfügbarkeit der Substrate gestiegen zu sein, da der Sauerstoffverbrauch sowohl unter P/M, als auch α KG deutlich über der Rate der unverdauten Herzen liegen, die respiratorischen Quotienten aber fast unverändert bleiben. Da sich, wie bereits erwähnt, auch hier der gleiche Unterschied zwischen P/M und α KG als Substrat in der state 3 Atmung zeigt, kann davon ausgegangen werden, dass nicht die Substratverfügbarkeit für die abweichende state 3 Atmung verantwortlich ist, sondern tatsächlich eine verminderte Lieferung des NADHs an die Atmungskette. Allerdings konnte nicht geklärt werden, ob auch die langsamere Dynamik im Aufbau von NAD(P)H unter Verwendung von α KG als Substrat Anteil an der geringeren Atmung im state 3 besitzt.

Eine weitere Beobachtung, die dafür spricht, dass das durch die α KGDH gebildete NADH vorwiegend zur Regeneration der antioxidativen Kapazität verwendet wird, ist die Tatsache, dass die NAD(P)H-Level durch Blockierung der Atmungskette mittels Rotenon unter P/M unverändert bleiben, während sie bei der Verwendung von α KGDH als Substrat maximiert werden (Abb. 25). Unter diesen Bedingungen stieg die ROS-Produktion unter P/M auf Grund der irregulären Reduktion von O₂ an Komplex I (I_Q) signifikant an. Bei Verwendung von α KG als Substrat

hingegen kommt es trotz der beobachteten Maximierung des NAD(P)H-Levels nicht zu einem Anstieg der H_2O_2 -Emission, was darauf hindeutet, dass fast kein NADH an der Atmungskette irregulär zur Oxidation von O_2 beiträgt. Unter ähnlichen Bedingungen wurden von Tretter und Kollegen ebenfalls H_2O_2 -Messungen durchgeführt, allerdings nicht in Mitochondrien, sondern an isoliertem Enzym. Dabei konnte die Arbeitsgruppe feststellen, dass es bei einer Maximierung des Verhältnisses von NADH zu NAD^+ zu einem massiven Anstieg der ROS-Entwicklung auf Grund der Rückwärtsreaktion an Untereinheit E3 der α KGDH kommt [82]. Dies wird auch durch eine erst kürzlich veröffentlichte Studie unterstützt, bei der Ambrus und Mitarbeiter auch in der Vorwärtsreaktion an isoliertem Enzymkomplex eine – wenn auch relativ geringe – Produktion von O_2^- beobachten konnten [2]. Die Diskrepanz zwischen diesen Ergebnissen und den hier vorliegenden Beobachtungen lassen sich möglicherweise damit erklären, dass in beiden Studien isoliertes Enzym zum Einsatz kam und somit die α KGDH außerhalb ihrer physiologischen Umgebung arbeiten musste. Daher scheint es durchaus gegeben, dass unter diesen „artifiziellen“ Bedingungen eine nicht unwesentliche Menge an ROS durch die α KGDH gebildet werden kann, dies unter physiologischen Bedingungen aber nur in vernachlässigbaren Mengen vorkommt, da hier z.B. die Rückwärtsreaktion an Untereinheit E3 auf Grund der Substratverfügbarkeit auch unter Stressbedingungen unwahrscheinlich erscheint.

Eine weitere Beobachtung, welche die aufgestellte These stützt, ist die Tatsache, dass es sowohl unter P/M, als auch α KG als Substrat zu einem Einbruch bzw. dem völligen Verlust des NAD(P)Hs kommt, wenn die α KGDH durch KMV inhibiert wird. Wenn in diesem Fall P/M als Substrat dient, steigt auch hier die ROS-Produktion an, da die α KGDH nicht mehr die Menge an NADH zur Regeneration der antioxidativen Kapazität liefert, wie ROS an der Atmungskette – trotz geringerer NAD(P)H-Level – entstehen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass in dieser Situation die NNT (s. Einleitung 4.2) statt mittels NADH den Aufbau von NADPH durchzuführen in einen Rückwärtsmodus übergeht, der unter Verbrauch von NADPH das verminderte NADH zu kompensieren versucht, wodurch die antioxidative Kapazität weiter herabgesetzt wird. Im Gegensatz dazu ist bei Verwendung von α KG als Substrat durch KMV zwar die Regeneration der antioxidativen Kapazität herabgesetzt, gleichzeitig gelangt aber nur eine relativ kleine Menge NADH an die Atmungskette, so dass es netto zu einer nur geringen Erhöhung der H_2O_2 -Emission kommt (Abb. 25 und vgl. Abb. 34). Der Grund dafür, dass auch unter diesen Umständen das Membranpotential mehr oder weniger aufrecht gehalten wird, konnte nicht abschließend geklärt werden. Denkbar ist hier für beide Messungen eine Beteiligung von ATP, welches durch interne Restmengen ADP aufgebaut wurde und jetzt durch seine Spaltung Energie liefert, um an der F_1F_0 -ATPase Protonen in den Intermembranraum zu pumpen, so dass ein Einbruch des Membranpotentials abgefangen wird. Diese Möglichkeit wird durch die Tatsache unterstützt, dass es

auch in BL/6J Mitochondrien, denen eine funktionelle NNT fehlt, nach Inhibition der α KGDH zu einem Einbruch der NAD(P)H-Level kommt, aber auch hier das Membranpotential „gepuffert“ wird (s. Anhang Abb. A.4).

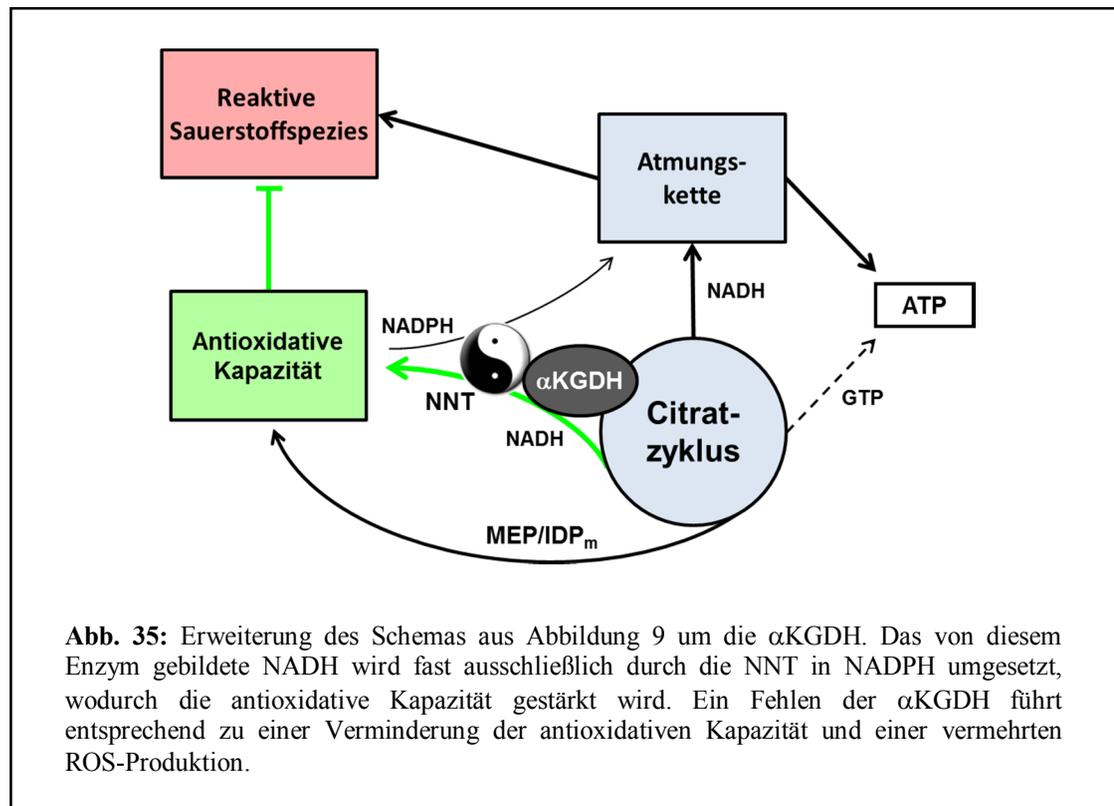
Durch diese Ergebnisse wird deutlich, dass die α KGDH eine wesentliche Rolle bei der Entgiftung von oxidativem Stress in isolierten Mitochondrien einnimmt. Entsprechende Messungen in Mitochondrien von DLST^{+/-} und WT Mäusen stützen diese These, da es auch hier in Abhängigkeit von der α KGDH-Aktivität zu einer vermehrten Produktion von H₂O₂ – v.a. unter hohen ADP-Konzentrationen – in Mitochondrien mit niedriger Aktivität kommt (Abb. 30). Des Weiteren zeigt sich, dass die α KGDH auch durchaus Einfluss auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch und damit die Atmung besitzt, da bei höheren ADP-Konzentrationen die state 3 Atmung in Mitochondrien mit niedriger α KGDH-Aktivität auch etwas niedriger ausfällt (Abb. 29). Allerdings ist dies möglicherweise auch darauf zurückzuführen, dass auf Grund der verminderten α KGDH-Aktivität der Flux durch den Citratzyklus herabgesetzt ist, so dass die entsprechende Atmung ebenfalls schwächer abläuft. Ein initialer Versuch hat gezeigt, dass die niedrige state 3 Atmung unter α KG durch die Zugabe von externem NADH (also nicht vom Enzym gebildet) gesteigert werden kann. Damit beeinflusst die α KGDH die mitochondriale ROS-Produktion auch indirekt, indem sie durch Limitierung der Citratzyklusrate auch die Menge an NADH definiert, die an der Atmungskette umgesetzt wird und so zur Entstehung von ROS beiträgt. Dies konnte auch durch die Messungen unter physiologischeren Bedingungen an der Zellverkürzungsanlage an isolierten Kardiomyozyten bestätigt werden. Auch hier kam es abhängig von der α KGDH-Aktivität zu einer signifikant höheren Oxidation von NAD(P)H und FAD⁺ bei physiologischem Stress in Zellen mit niedriger α KGDH-Aktivität im Vergleich zu Zellen mit mittlerer bzw. hoher Aktivität. Gleichzeitig kam es in den Zellen mit niedriger α KGDH-Aktivität zu einer erhöhten Produktion von zellulären ROS (vgl. Abb. 31 und 32).

Die Beobachtungen, dass DLST^{+/-} Mäuse einen erhöhten oxidativen Stress entwickeln, stehen auch im Konsens mit den Arbeiten von Dumont und Kollegen. Diese konnten zeigen, dass in einem Mausmodell für Alzheimerentwicklung die Progression deutlich schneller voranschreitet, wenn die Mäuse eine Defizienz für die DLST Untereinheit der α KGDH besitzen und dass dies mit einem erhöhten Ausmaß an oxidativem Stress verbunden ist [17].

NNT ist wichtiges Bindeglied zwischen α KGDH und antioxidativer Kapazität

Im Gegensatz zu den Beobachtungen in Herzmitochondrien aus C57BL/6N Mäusen, in denen die α KGDH ein wichtiger Teil der Entgiftungsmaschinerie für ROS ist, beobachteten Quinlan und Kollegen einen massiven ROS-Anstieg in Skelettmuskelmitochondrien unter Verwendung von α KG als Substrat. Dies wurde allerdings nur dann beobachtet, wenn die Atmungskette ebenfalls mittels Rotenon blockiert wurde. Durch die Zugabe von KMV, also der Inhibierung der α KGDH, ging die H_2O_2 -Produktion wieder sichtlich zurück, so dass diese Gruppe daraus schloss, dass α KGDH eine wichtige Quelle für mitochondriale ROS darstellt [69]. Ein wichtiger Unterschied zwischen Skelettmuskel und Herz ist dabei allerdings die Anwesenheit der NNT, welche im Skelettmuskel nicht exprimiert wird. Entsprechend konnten mit Messungen in Herzmitochondrien aus C57BL/6J Mäusen, denen ebenfalls dieses Enzym fehlt (s. Einleitung) die Beobachtungen von Quinlan und Kollegen bei der Verwendung von α KG als Substrat reproduziert werden (P/M ergab die gleichen Ergebnisse wie in BL/6N Mäusen; Abb. 26). Zusätzlich zeigte sich, dass ohne eine funktionelle NNT die initiale ROS-Produktion mit Substrat alleine bereits deutlich höher liegt, als in BL/6N Mäusen bzw. unter Verwendung von P/M als Substrat. Dies ist dadurch zu erklären, dass zum einen durch den Eintritt in den Citratzyklus an der Stelle der α KGDH die Regeneration der antioxidativen Kapazität via Isocitratdehydrogenase und Malatdehydrogenase deutlich herabgesetzt ist. Zum anderen steht jetzt durch das Fehlen der NNT das von der α KGDH gebildete NADH ausschließlich für die Oxidation an der Atmungskette zur Verfügung (vgl. Abb. 34). Entsprechend kommt es dort auf Grund der verminderten antioxidativen Kapazität zu einer erhöhten ROS-Bildung bereits unter basalen Bedingungen. Diese wird entsprechend durch die Blockierung der Atmungskette mittels Rotenon weiter gesteigert, durch eine Inhibition der α KGDH allerdings minimiert, da nun weniger NADH für die irreguläre Oxidation von O_2^- an der Atmungskette zur Verfügung steht. Diese Hypothese wird auch weiter dadurch gestützt, dass in BL/6N Mitochondrien, deren antioxidative Kapazität mittels DNCB depletiert wurde, eine zehnfache Erhöhung des oxidativen Stresses unter basalen Bedingungen beobachtet werden kann, was durch die Blockierung der Atmungskette weiter gesteigert wurde. Unter α KG hingegen ist basal nur eine Verdoppelung der ROS-Produktion zu beobachten, welche durch die Blockierung der Atmungskette nicht weiter gesteigert werden kann. Bei Fehlen der NNT hingegen zeigt sich unter P/M das gleiche Bild wie in BL/6N Mitochondrien, unter α KG hingegen kommt es basal zunächst nur zu einer leichten Steigerung des oxidativen Stresses, der allerdings durch die Blockierung der Atmungskette durch Rotenon deutlich erhöht wird, durch die Inhibition der α KG allerdings deutlich vermindert wird. Demnach ist es möglich, dass die Beobachtungen von Quinlan und Kollegen auf das Fehlen der NNT in Verbindung mit Rotenon zur Blockierung der Atmungskette zurückzuführen sind und der ROS-Anstieg nicht durch

die α KGDH selbst bedingt ist, sondern durch eine vermehrte O_2^- -Produktion an Komplex I_Q. Entsprechend ergibt sich, dass die α KGDH einen wichtigen Teil der antioxidativen Kapazität darstellt, indem sie zum einen den Flux durch den Citratzyklus reguliert und zum anderen das bei der Umsetzung von α KG zu Succinyl-CoA gebildete NADH vorwiegend zur Regeneration von NADPH via NNT bereitstellt (Abb. 35).



Diese Hypothese gibt auch eine Erklärung, warum die C57BL/6J Mitochondrien unter α KG eine leicht stärkere state 3 Atmung besitzen. Durch das Fehlen einer funktionellen NNT steht potenziell mehr NADH zur Verfügung, welches an der Atmungskette oxidiert werden kann. Des Weiteren ist die α KGDH durch ihre Beteiligung an der Entgiftung von H_2O_2 möglicherweise auch ein neues Ziel zur Behandlung der Herzinsuffizienz. Es wurde bereits gezeigt, dass im Plasma von Patienten mit Herzinsuffizienz verschiedene Metabolite gehäuft vorkommen und dadurch als Marker zur Früherkennung einer Herzinsuffizienz dienen könnten, darunter auch α KG [18]. Eine Anhäufung von α KG im Serum spräche entsprechend für eine Fehlfunktion der α KGDH. Dies konnte in eigenen Versuchen an humanen Proben nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), allerdings war die Aktivität der α KGDH in isolierten Mitochondrien nach zwei Tagen Lagerung bei -80°C bereits um 50 % reduziert, so dass keine genaue Aussage für die ebenfalls bei -80°C gelagerten humanen Proben getroffen werden konnte. Falls in Patienten mit Herzinsuffizienz eine Fehlfunktion

der α KGDH vorliegen würde, bleibt dennoch offen, ob dieses Enzym auch als neues therapeutischen Target zum Einsatz kommen könnte, da es äußerst schwierig ist, die α KGDH gezielt im Herzen zu manipulieren. Denkbar wäre eine genetische Behandlung durch virale Vektoren mit funktionsfähigem Enzym. Dennoch wird durch die vorliegenden Versuche ein weiterer Gesichtspunkt aufgedeckt, wie es innerhalb von Kardiomyozyten zu oxidativem Stress kommt, der letztendlich mitverantwortlich für die Ausbildung einer Herzinsuffizienz ist und somit ebenfalls ein Angriffspunkt für eine Therapie bietet.

V. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abraham, W.T., et al., *Coordinate changes in Myosin heavy chain isoform gene expression are selectively associated with alterations in dilated cardiomyopathy phenotype*. Mol Med, 2002. **8**(11): p. 750-60.
2. Ambrus, A., et al., *Formation of reactive oxygen species by human and bacterial pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complexes reconstituted from recombinant components*. Free Radic Biol Med, 2015. **89**: p. 642-650.
3. Aon, M.A., et al., *Glutathione/thioredoxin systems modulate mitochondrial H₂O₂ emission: an experimental-computational study*. J Gen Physiol, 2012. **139**(6): p. 479-91.
4. Applegate, M.A., K.M. Humphries, and L.I. Szwedda, *Reversible inhibition of alpha-ketoglutarate dehydrogenase by hydrogen peroxide: glutathionylation and protection of lipoic acid*. Biochemistry, 2008. **47**(1): p. 473-8.
5. Awasthi, Y.C., et al., *Enzymatic conjugation of erythrocyte glutathione with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene: the fate of glutathione conjugate in erythrocytes and the effect of glutathione depletion on hemoglobin*. Blood, 1981. **58**(4): p. 733-8.
6. Backs, J., et al., *The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(7): p. 2342-7.
7. Backs, J., et al., *CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy*. J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1853-64.
8. Bannister, A.J., et al., *Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 120-4.
9. Barski, A., et al., *High-resolution profiling of histone methylations in the human genome*. Cell, 2007. **129**(4): p. 823-37.
10. Belch, J.J., et al., *Oxygen free radicals and congestive heart failure*. Br Heart J, 1991. **65**(5): p. 245-8.
11. Bulteau, A.L., M. Ikeda-Saito, and L.I. Szwedda, *Redox-dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria*. Biochemistry, 2003. **42**(50): p. 14846-55.
12. Chinopoulos, C., *Which way does the citric acid cycle turn during hypoxia? The critical role of alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex*. J Neurosci Res, 2013. **91**(8): p. 1030-43.
13. da Costa Martins, P.A., et al., *MicroRNA-199b targets the nuclear kinase Dyrk1a in an auto-amplification loop promoting calcineurin/NFAT signalling*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(12): p. 1220-7.
14. Dai, D.F., et al., *Mitochondrial proteome remodelling in pressure overload-induced heart failure: the role of mitochondrial oxidative stress*. Cardiovasc Res, 2012. **93**(1): p. 79-88.
15. Dai, D.F., et al., *Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging*. Circulation, 2009. **119**(21): p. 2789-97.
16. Denton, R.M., D.A. Richards, and J.G. Chin, *Calcium ions and the regulation of NAD⁺-linked isocitrate dehydrogenase from the mitochondria of rat heart and other tissues*. Biochem J, 1978. **176**(3): p. 899-906.
17. Dumont, M., et al., *Mitochondrial dihydrolipoyl succinyltransferase deficiency accelerates amyloid pathology and memory deficit in a transgenic mouse model of amyloid deposition*. Free Radic Biol Med, 2009. **47**(7): p. 1019-27.
18. Dunn, W.B., et al., *Serum metabolomics reveals many novel metabolic markers of heart failure, including pseudouridine and 2-oxoglutarate*. Metabolomics, 2007. **3**(4): p. 413-426.
19. Ellman, G.L., *A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans*. Arch Biochem Biophys, 1958. **74**(2): p. 443-50.
20. Feldman, A.M., et al., *Selective gene expression in failing human heart. Quantification of steady-state levels of messenger RNA in endomyocardial biopsies using the polymerase chain reaction*. Circulation, 1991. **83**(6): p. 1866-72.

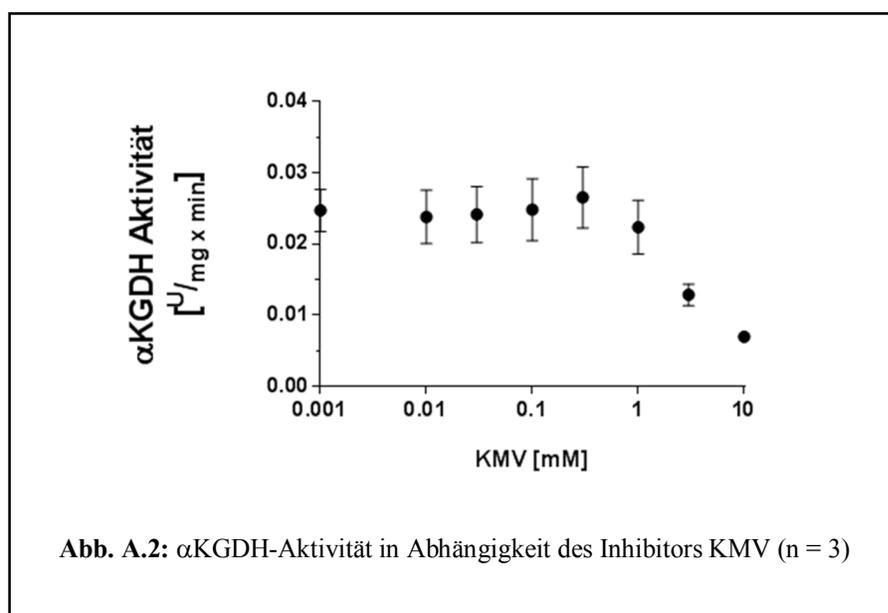
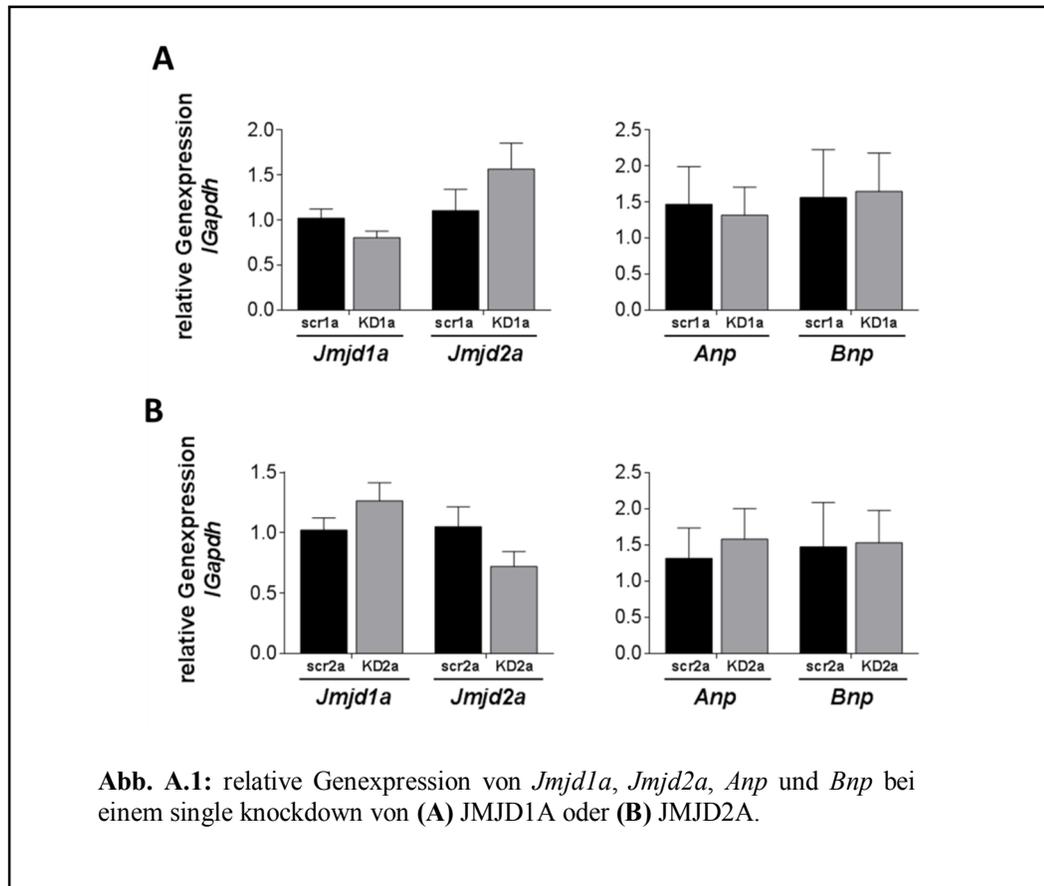
21. Figueiredo, L.M., G.A. Cross, and C.J. Janzen, *Epigenetic regulation in African trypanosomes: a new kid on the block*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(7): p. 504-13.
22. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
23. Gorisch, S.M., et al., *Histone acetylation increases chromatin accessibility*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 24): p. 5825-34.
24. Graff, J. and I.M. Mansuy, *Epigenetic codes in cognition and behaviour*. Behav Brain Res, 2008. **192**(1): p. 70-87.
25. Hassan, M.Q., et al., *Non-coding RNAs: Epigenetic regulators of bone development and homeostasis*. Bone, 2015. **81**: p. 746-56.
26. Heineke, J. and J.D. Molkentin, *Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(8): p. 589-600.
27. Hohl, M., et al., *HDAC4 controls histone methylation in response to elevated cardiac load*. J Clin Invest, 2013. **123**(3): p. 1359-70.
28. Ide, T., et al., *Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction*. Circ Res, 2001. **88**(5): p. 529-35.
29. Izban, M.G. and D.S. Luse, *Factor-stimulated RNA polymerase II transcribes at physiological elongation rates on naked DNA but very poorly on chromatin templates*. J Biol Chem, 1992. **267**(19): p. 13647-55.
30. Jones, P.A., *DNA methylation and cancer*. Cancer Res, 1986. **46**(2): p. 461-6.
31. Karagiannis, T.C. and K. Ververis, *Potential of chromatin modifying compounds for the treatment of Alzheimer's disease*. Pathobiol Aging Age Relat Dis, 2012. **2**.
32. Kempf, T., H. Drexler, and K.C. Wollert, *[Pathophysiology of heart failure]*. Internist (Berl), 2007. **48**(9): p. 899-908.
33. Kilter, H. and M. Bohm, *[From hypertension to heart failure-a pathophysiological continuum]*. Herz, 2004. **29**(3): p. 239-47.
34. Kim, G.W. and X.J. Yang, *Comprehensive lysine acetylomes emerging from bacteria to humans*. Trends Biochem Sci, 2011. **36**(4): p. 211-20.
35. Kirchhefer, U., et al., *Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts*. Cardiovasc Res, 1999. **42**(1): p. 254-61.
36. Knezetic, J.A. and D.S. Luse, *The presence of nucleosomes on a DNA template prevents initiation by RNA polymerase II in vitro*. Cell, 1986. **45**(1): p. 95-104.
37. Kogler, H., et al., *Relevance of brain natriuretic peptide in preload-dependent regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase expression*. Circulation, 2006. **113**(23): p. 2724-32.
38. Kornberg, R.D., *Structure of chromatin*. Annu Rev Biochem, 1977. **46**: p. 931-54.
39. Korshunov, S.S., V.P. Skulachev, and A.A. Starkov, *High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria*. FEBS Lett, 1997. **416**(1): p. 15-8.
40. Krebs, H.A. and W.A. Johnson, *The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues*. FEBS Lett, 1980. **117 Suppl**: p. K1-10.
41. Lachner, M., et al., *Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HPI proteins*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 116-20.
42. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. Science, 2001. **294**(5543): p. 853-8.
43. Lee, D.Y., et al., *A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA*. Cell, 1993. **72**(1): p. 73-84.
44. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
45. Lin, M.T. and M.F. Beal, *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases*. Nature, 2006. **443**(7113): p. 787-95.

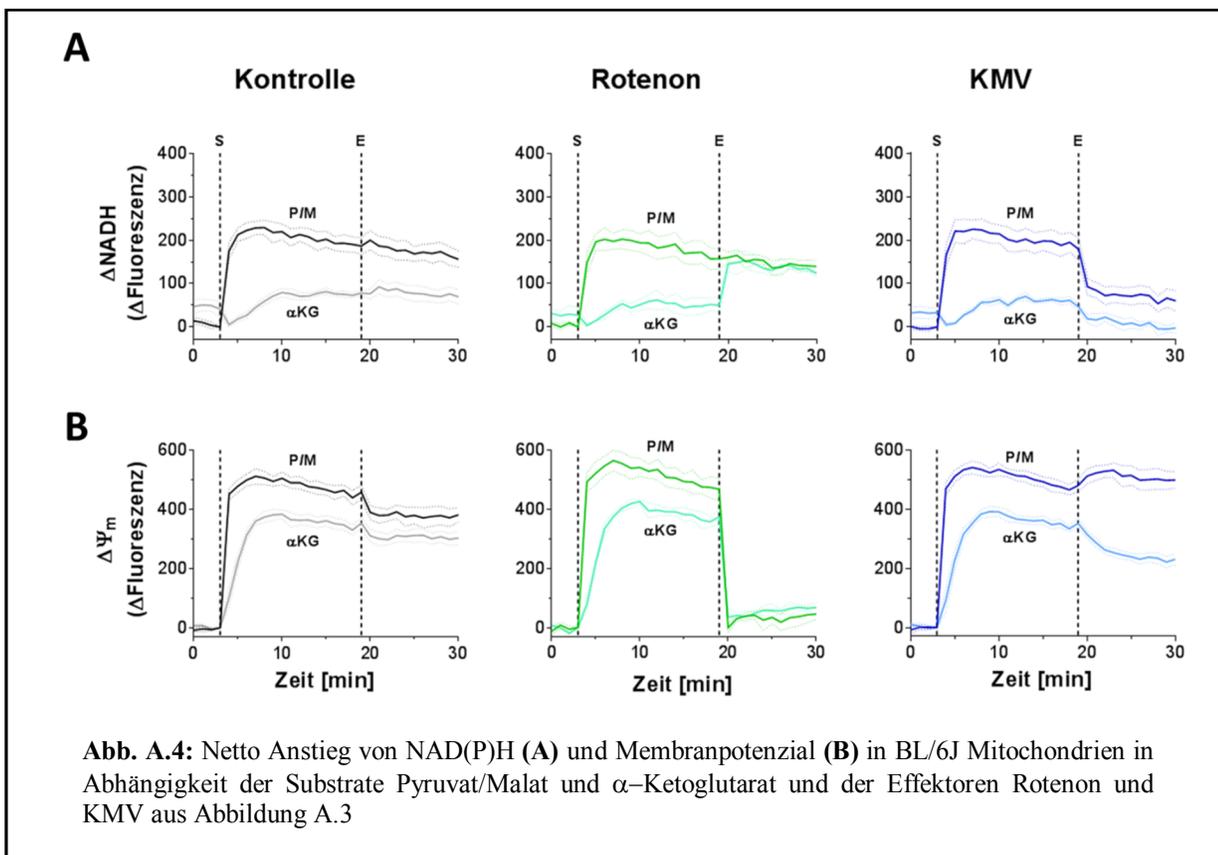
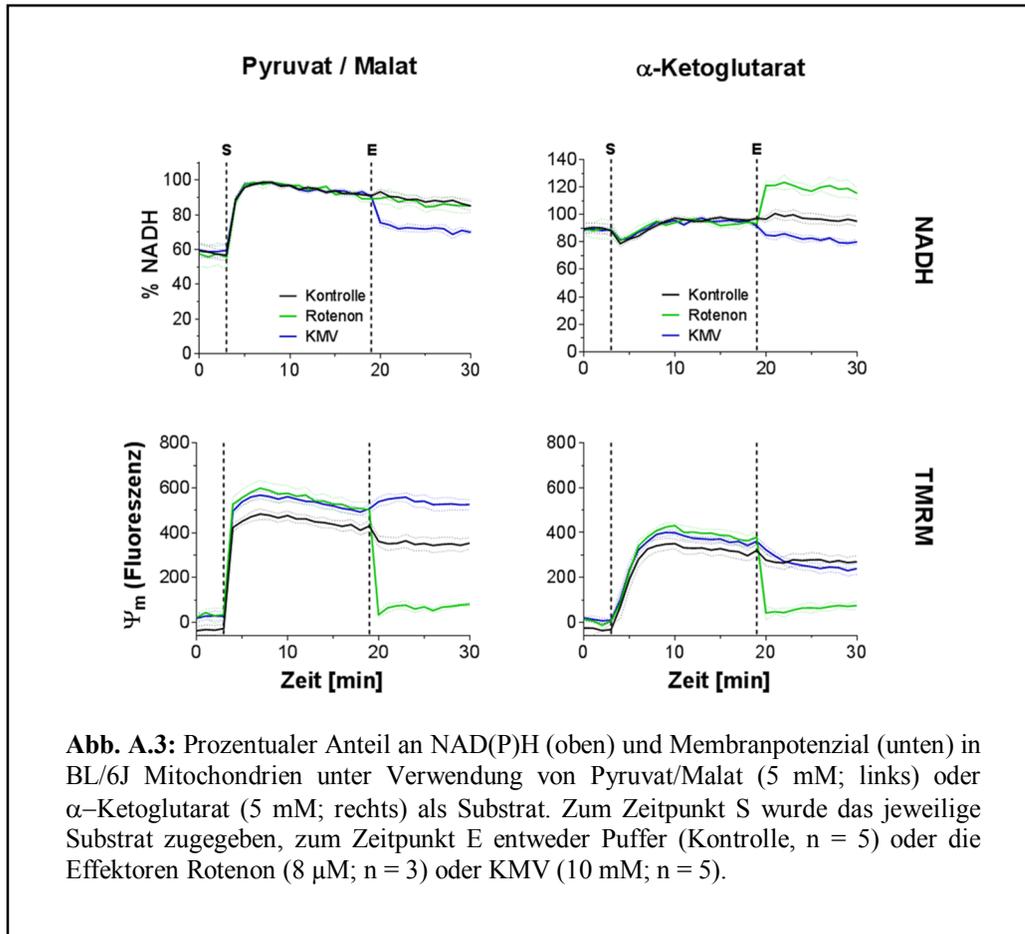
46. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
47. Lockman, K., J.M. Taylor, and C.P. Mack, *The histone demethylase, Jmjd1a, interacts with the myocardin factors to regulate SMC differentiation marker gene expression*. *Circ Res*, 2007. **101**(12): p. e115-23.
48. Lu, J., et al., *Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(8): p. 4070-5.
49. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. *Nature*, 1997. **389**(6648): p. 251-60.
50. Marinova, Z., et al., *Histone deacetylase inhibition alters histone methylation associated with heat shock protein 70 promoter modifications in astrocytes and neurons*. *Neuropharmacology*, 2011. **60**(7-8): p. 1109-15.
51. Marmorstein, R., *Structure and function of histone acetyltransferases*. *Cell Mol Life Sci*, 2001. **58**(5-6): p. 693-703.
52. Matsushima, S., et al., *Overexpression of mitochondrial peroxiredoxin-3 prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice*. *Circulation*, 2006. **113**(14): p. 1779-86.
53. Mayer, S.C., et al., *Adrenergic Repression of the Epigenetic Reader MeCP2 Facilitates Cardiac Adaptation in Chronic Heart Failure*. *Circ Res*, 2015. **117**(7): p. 622-33.
54. McCormack, J.G. and R.M. Denton, *Role of Ca²⁺ ions in the regulation of intramitochondrial metabolism in rat heart. Evidence from studies with isolated mitochondria that adrenaline activates the pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase complexes by increasing the intramitochondrial concentration of Ca²⁺*. *Biochem J*, 1984. **218**(1): p. 235-47.
55. McKinsey, T.A., et al., *Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation*. *Nature*, 2000. **408**(6808): p. 106-11.
56. McLain, A.L., P.A. Szweda, and L.I. Szweda, *alpha-Ketoglutarate dehydrogenase: a mitochondrial redox sensor*. *Free Radic Res*, 2011. **45**(1): p. 29-36.
57. McMurray, J.J., et al., *ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. *Eur J Heart Fail*, 2012. **14**(8): p. 803-69.
58. Miranda, T.B. and P.A. Jones, *DNA methylation: the nuts and bolts of repression*. *J Cell Physiol*, 2007. **213**(2): p. 384-90.
59. Miska, E.A., et al., *HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor*. *EMBO J*, 1999. **18**(18): p. 5099-107.
60. Mittmann, C., et al., *Analysis of gene expression patterns in small amounts of human ventricular myocardium by a multiplex RNase protection assay*. *J Mol Med (Berl)*, 1998. **76**(2): p. 133-40.
61. Miyata, S., et al., *Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart*. *Circ Res*, 2000. **86**(4): p. 386-90.
62. Mosammaparast, N. and Y. Shi, *Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases*. *Annu Rev Biochem*, 2010. **79**: p. 155-79.
63. Napoli, C., C. Lemieux, and R. Jorgensen, *Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans*. *Plant Cell*, 1990. **2**(4): p. 279-289.
64. Nickel, A., M. Kohlhaas, and C. Maack, *Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination*. *J Mol Cell Cardiol*, 2014. **73**: p. 26-33.
65. Nickel, A.G., et al., *Reversal of Mitochondrial Transhydrogenase Causes Oxidative Stress in Heart Failure*. *Cell Metab*, 2015.
66. Nulton-Persson, A.C. and L.I. Szweda, *Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(26): p. 23357-61.

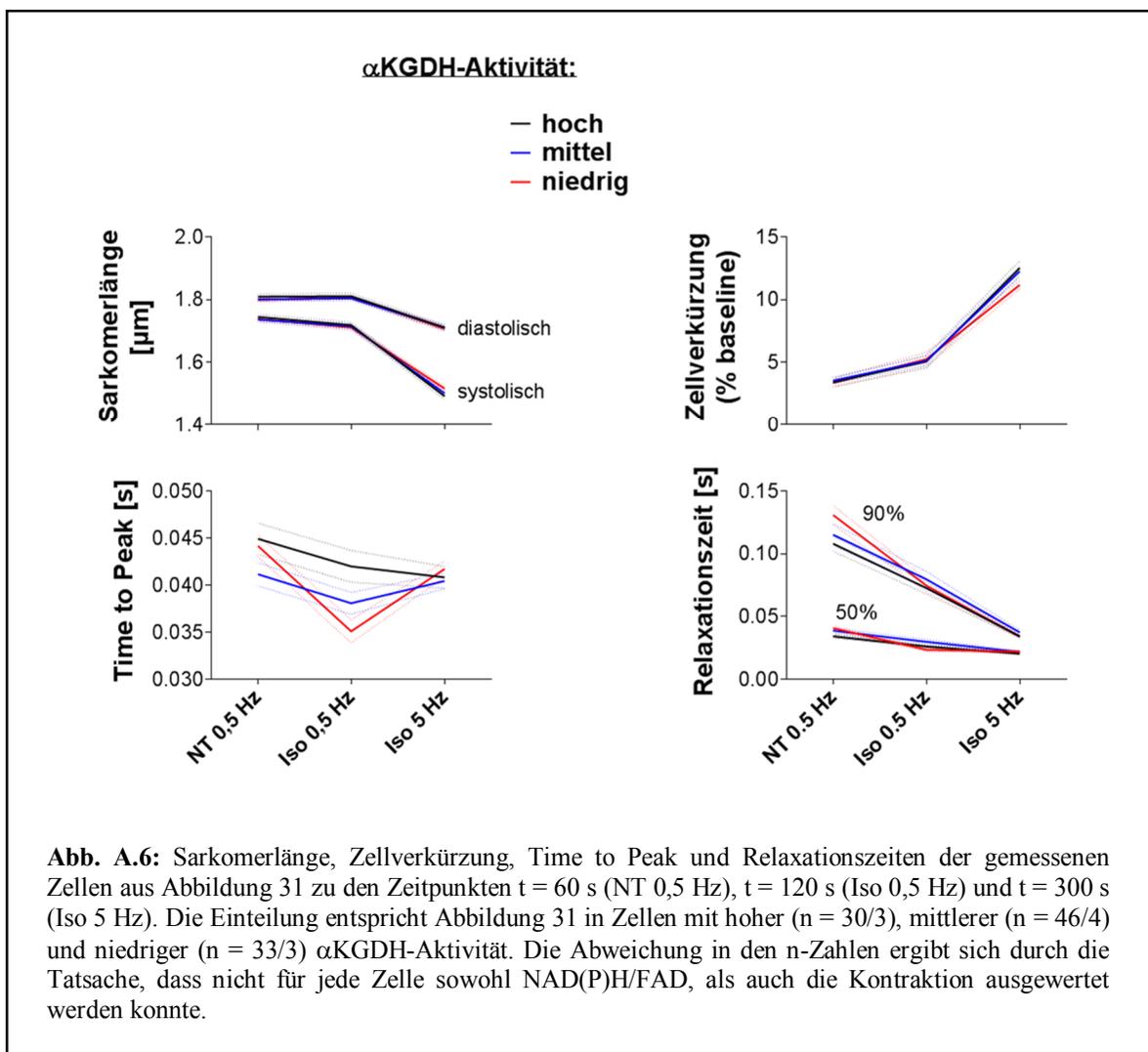
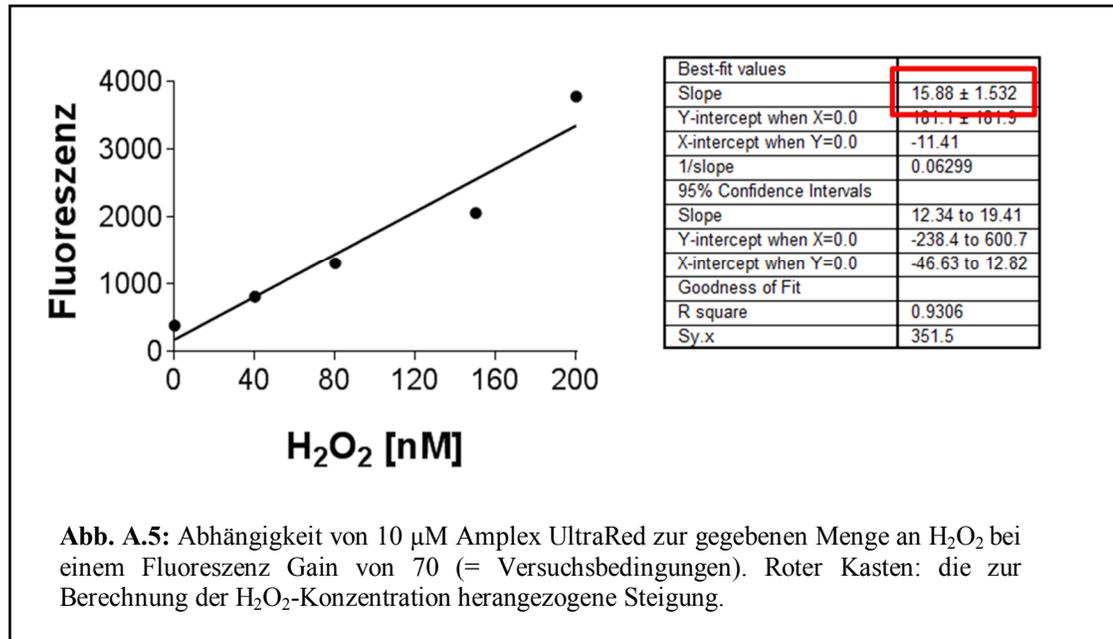
67. Ostrovtsova, S.A. and S.A. Strumilo, *Participation of adenosine diphosphate in regulation of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex from human heart*. Biomed Biochim Acta, 1990. **49**(6): p. 515-7.
68. Palade, G.E., *The fine structure of mitochondria*. Anat Rec, 1952. **114**(3): p. 427-51.
69. Quinlan, C.L., et al., *The 2-Oxoacid Dehydrogenase Complexes in Mitochondria Can Produce Superoxide/Hydrogen Peroxide at Much Higher Rates than Complex I*. J Biol Chem, 2014.
70. Rea, S., et al., *Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases*. Nature, 2000. **406**(6796): p. 593-9.
71. Richards, E.J. and S.C. Elgin, *Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects*. Cell, 2002. **108**(4): p. 489-500.
72. Rydstrom, J., *Mitochondrial NADPH, transhydrogenase and disease*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1757**(5-6): p. 721-6.
73. Sailaja, B.S., et al., *Stress-induced epigenetic transcriptional memory of acetylcholinesterase by HDAC4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(52): p. E3687-95.
74. Saito, Y., et al., *Augmented expression of atrial natriuretic polypeptide gene in ventricle of human failing heart*. J Clin Invest, 1989. **83**(1): p. 298-305.
75. Shi, Y., et al., *Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1*. Cell, 2004. **119**(7): p. 941-53.
76. Sohal, R.S. and R. Weindruch, *Oxidative stress, caloric restriction, and aging*. Science, 1996. **273**(5271): p. 59-63.
77. Stratthdee, G., A. Sim, and R. Brown, *Control of gene expression by CpG island methylation in normal cells*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt 6): p. 913-5.
78. Strumilo, S.A., V.V. Vinogradov, and S.B. Senkevich, [*Kinetic and regulatory properties of alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex from bovine adrenals*]. Ukr Biokhim Zh (1978), 1980. **52**(3): p. 321-4.
79. Suematsu, N., et al., *Oxidative stress mediates tumor necrosis factor-alpha-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes*. Circulation, 2003. **107**(10): p. 1418-23.
80. Tanaka, N., et al., *Mammalian -keto acid dehydrogenase complexes. VII. Resolution and reconstitution of the pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex*. J Biol Chem, 1972. **247**(12): p. 4043-9.
81. Toye, A.A., et al., *A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice*. Diabetologia, 2005. **48**(4): p. 675-86.
82. Tretter, L. and V. Adam-Vizi, *Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase*. J Neurosci, 2004. **24**(36): p. 7771-8.
83. Tsukada, Y., et al., *Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins*. Nature, 2006. **439**(7078): p. 811-6.
84. Vaute, O., et al., *Functional and physical interaction between the histone methyl transferase Suv39H1 and histone deacetylases*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(2): p. 475-81.
85. Wagner, S., et al., *Redox regulation of sodium and calcium handling*. Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(9): p. 1063-77.
86. Wang, K., et al., *The long noncoding RNA CHRF regulates cardiac hypertrophy by targeting miR-489*. Circ Res, 2014. **114**(9): p. 1377-88.
87. Weber, K.T., Y. Sun, and E. Guarda, *Structural remodeling in hypertensive heart disease and the role of hormones*. Hypertension, 1994. **23**(6 Pt 2): p. 869-77.
88. Wencker, D., et al., *A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure*. J Clin Invest, 2003. **111**(10): p. 1497-504.
89. Wolffe, A.P. and M.A. Matzke, *Epigenetics: regulation through repression*. Science, 1999. **286**(5439): p. 481-6.
90. Yang, L., et al., *Mice deficient in dihydrolipoyl succinyl transferase show increased vulnerability to mitochondrial toxins*. Neurobiol Dis, 2009. **36**(2): p. 320-30.

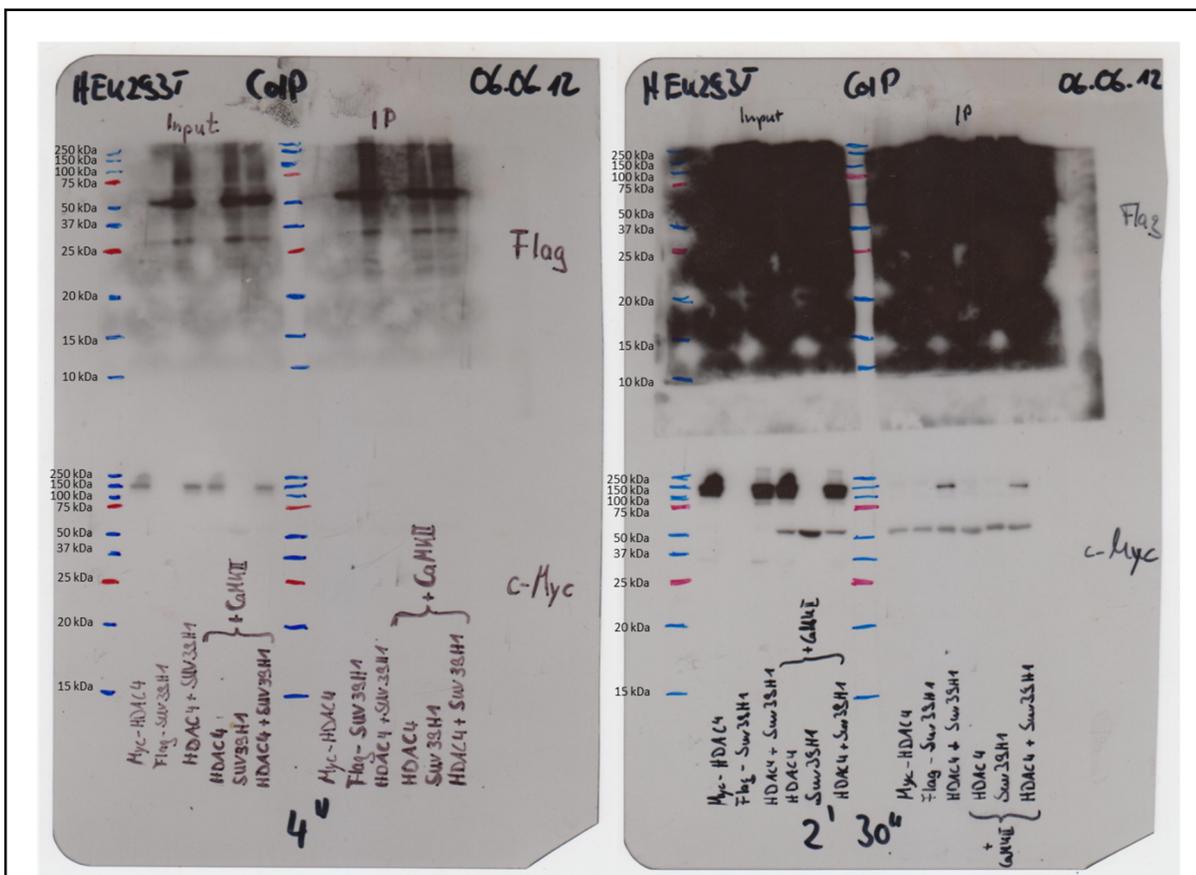
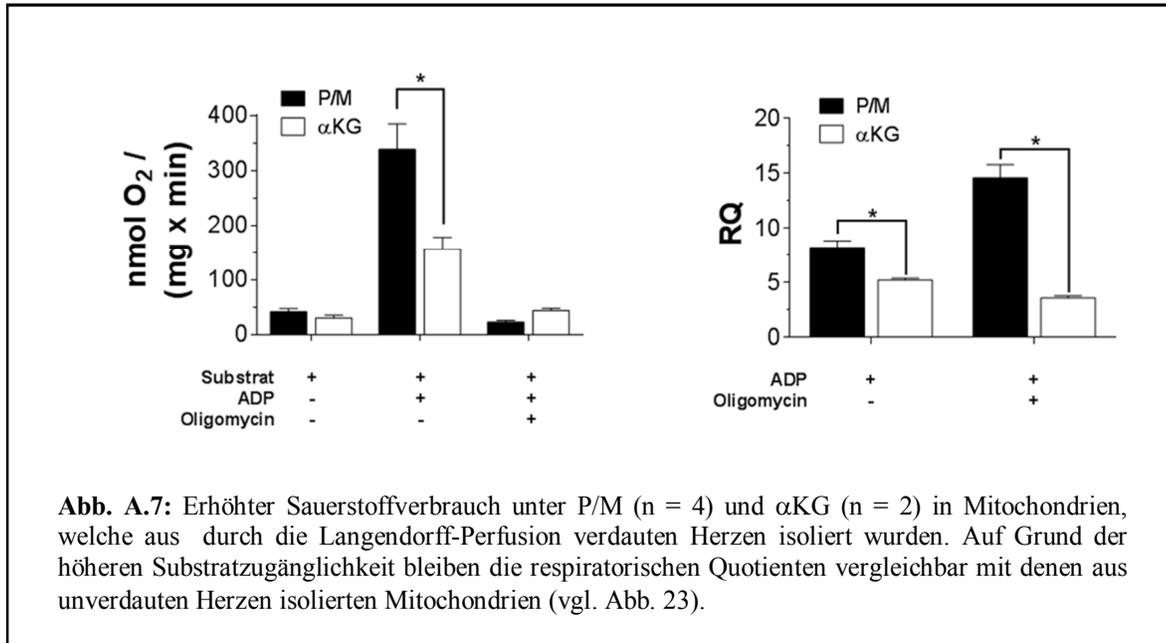
91. Ying, W., *NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences*. *Antioxid Redox Signal*, 2008. **10**(2): p. 179-206.
92. Zhang, C.L., et al., *Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy*. *Cell*, 2002. **110**(4): p. 479-88.
93. Zhang, C.L., T.A. McKinsey, and E.N. Olson, *Association of class II histone deacetylases with heterochromatin protein 1: potential role for histone methylation in control of muscle differentiation*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(20): p. 7302-12.
94. Zhang, Q.J., et al., *The histone trimethyllysine demethylase JMJD2A promotes cardiac hypertrophy in response to hypertrophic stimuli in mice*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(6): p. 2447-56.

VI. ANHANG

Zusätzliche Abbildungen







VII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	-	Ampere
Abb.	-	Abbildung
Anm.	-	Anmerkung
bpm	-	Beats per minute (Schläge pro Minute)
bzgl.	-	bezüglich
bzw.	-	beziehungsweise
°C	-	Grad Celsius
c.a.	-	circa
<i>C. elegans</i>	-	Caenorhabditis Elegans (Fadenwurm)
CoA	-	Coenzym A
d.h.	-	das heißt
dt.	-	deutsch
DNA	-	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	-	Desoxyribonukleosidtriphosphate
for	-	forward (vorwärts)
g	-	Gramm oder Beschleunigung Zentrifuge
ggf.	-	gegebenenfalls
h	-	Stunden
Hz	-	Hertz (= 1/min)
i.A.	-	im Allgemeinen
I.E.	-	Injektionseinheiten
l	-	Liter
lncRNA	-	long non-coding RNA
M	-	molar
m...	-	milli...
μ...	-	mikro...
min.	-	Minute
miRNA	-	microRNA
n...	-	nano...
RNA	-	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rev	-	reverse (rückwärts)
rpm	-	rounds per minute (Umdrehung pro Minute)
ROS	-	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)

s.	-	siehe
sek.	-	Sekunde
siRNA	-	short interfering RNA
s.o.	-	siehe oben
sog.	-	so genannt
s.u.	-	siehe unten
Tab.	-	Tabelle
u.a.	-	unter anderem
V	-	Volt
v.a.	-	vor allem
vgl.	-	vergleiche
Vol.	-	Volumenanteil
z.B.	-	zum Beispiel
z.T.	-	zum Teil

VIII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Progression der Herzinsuffizienz.....	2
Abb. 2: Schematische Darstellung der DNA-Nukleosom-Interaktion und der Faltung der DNA in Chromatin.....	4
Abb. 3: Übersicht über die am häufigsten vorkommenden Modifikationen der Histonarme	5
Abb. 4: Aufbau und Lokalisation metallionenabhängiger Histondeacetylasen (HDAC)	7
Abb. 5: Schematische Darstellung eines Mitochondriums mit innerer und äußerer Membran sowie den charakteristischen Einstülpungen der inneren Membran (Cristae)	8
Abb. 6: Schematische Darstellung der oxidativen Phosphorylierung.....	9
Abb. 7: Schematische Darstellung des Citratzyklus und der an den einzelnen Reaktionen beteiligten Enzyme.....	10
Abb. 8: Schematische Darstellung der mitochondrialen antioxidativen Kapazität	11
Abb. 9: Schematische Darstellung der Zusammenhänge zwischen Energiebedarf, ROS Entwicklung und antioxidativer Kapazität.....	12
Abb. 10: Reaktionsmechanismus der Histondemethylierung durch Jmjd-Enzyme.....	15
Abb. 11: Schematischer Aufbau des verwendeten Langendorff-Perfusions-Systems.....	31
Abb. 12: Schematische Darstellung des ChIP-Assay.....	38
Abb. 13: Schematischer Aufbau der IonOptix Zellverkürzungsanlage inklusive Mikroskop und Zubehör	43
Abb. 14: Schematische Darstellung des angewendeten Stressprotokolls	44
Abb. 15: Prinzip der GSH/GSSG-Messung mittels DTNB.....	47

Abb. 16: (A) Relative Genexpression verschiedener Markergene in adulten (n = 4) und neonatalen (n = 6) Rattenkardiomyozyten. (B) Realtime-PCR Analysen von ChIP-Assays für H3K9me2 und H3K9me3 im Promotorbereich von <i>Anp</i> und <i>Bnp</i> in adulten und neonatalen Rattenkardiomyozyten (jeweils n = 3).....	52
Abb. 17: Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen von transfizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten kurz vor der Ernte.....	54
Abb. 18: Expression verschiedener Gene und Methylierung im Promotorbereich von <i>Anp</i> und <i>Bnp</i> in NRCMs nach siRNA-Transfektion	55
Abb. 19: Lokalisation von HDAC4 und SUV39H1 nach Transfektion in cos1-Zellen mit und ohne Cotransfektion von CaMKII δ B-T287D.....	56
Abb. 20: Coimmunopräzipitation von SUV39H1 und HDAC4 in Abhängigkeit von CaMKII δ B-T287D.....	57
Abb. 21: Genexpression und H3K9 Methylierung (Promotorbereich) von <i>Anp</i> (A) und <i>Bnp</i> (B) in den vier Gruppen WT Kontrolle (n = 3), DLST ^{+/-} Kontrolle (n = 2), WT Nachlast (n = 2) und DLST ^{+/-} Nachlast (n = 4)	59
Abb. 22: Bestimmung des Gesamt-GSH und des Anteils an GSSG sowie ihr Verhältnis zueinander als Indikator für oxidativen Stress in den einzelnen Gruppen WT Kontrolle (n = 3), DLST ^{+/-} Kontrolle (n = 2), WT Nachlast (n = 2), DLST ^{+/-} Nachlast (n = 4).....	60
Abb. 23: Mitochondriale Atmung in BL/6N (links) und BL/6J Mäusen (rechts) unter den Substraten Pyruvat/Malat (5mM; schwarz) und α -Ketoglutarat (5 mM; weiß).....	61
Abb. 24: Prozentualer Anteil an NAD(P)H (oben) und Membranpotential (unten) in BL/6N Mitochondrien unter Verwendung von Pyruvat/Malat (5 mM; links) oder α -Ketoglutarat (5 mM; rechts) als Substrat.....	63
Abb. 25: Netto Anstieg von NAD(P)H (A) und Membranpotential (B) in BL/6N Mitochondrien in Abhängigkeit der Substrate Pyruvat/Malat und α -Ketoglutarat und der Effektoren Rotenon und KMV aus Abbildung 24.....	64
Abb. 26: Mitochondriale ROS-Produktion in C57BL/6N (oben) und C57BL/6J (unten) Mäusen in Abhängigkeit von den Substraten Pyruvat/Malat (5 mM; links) und α -Ketoglutarat (5 mM; rechts)	65

Abb. 27: Mitochondriale ROS-Produktion in C57BL/6N (oben) und C57BL/6J (unten) Mäusen in Abhängigkeit von den Substraten Pyruvat/Malat (5 mM; links) und α -Ketoglutarat (5 mM; rechts)	67
Abb. 28: Enzymaktivitäten der α KGDH, Aconitase, IDH und MDH in Mitochondrien aus DLST-Herzen	69
Abb. 29: Sauerstoffverbrauch und respiratorische Quotienten der Mitochondrien mit hoher (n = 5), mittlerer (n = 5) und niedriger (n = 5) α KGDH-Aktivität unter α -Ketoglutarat als Substrat (5 mM)	70
Abb. 30: Kinetik der H ₂ O ₂ -Produktion unter α -Ketoglutarat als Substrat (5 mM) in den Mitochondrien mit hoher (A; n = 5), mittlerer (B; n = 6) und niedriger (C; n = 6) α KGDH-Aktivität. (D) Kumulative H ₂ O ₂ -Konzentration nach 10 Minuten Messzeit.....	71
Abb. 31: Redoxstatus von NAD(P)H und FAD (oben) und Ratio von NAD(P)H/FAD als Maß des Oxidationsstatus (unten) in Zellen mit hoher (n = 29/3[Zellen/Herzen]), mittlerer (n = 45/4) und niedriger (n = 32/3) α KGDH-Aktivität.....	72
Abb. 32: ROS-Produktion in Zellen mit hoher (n = 18/2), mittlerer (n = 12/2) und niedriger (n = 23/3) α KGDH-Aktivität.....	74
Abb. 33: Potentieller Mechanismus zum epigenetischen Remodeling während der Herzinsuffizienz	78
Abb. 34: Schema zur Auswirkung der Substratwahl und der eingesetzten Effektoren in C57BL/6N und C57BL/6J Mäusen.....	81
Abb. 35: Erweiterung des Schemas aus Abbildung 9 um die α KGDH.....	85

Abb. A.1: relative Genexpression von Jmjd1a, Jmjd2a, Anp und Bnp bei einem single knockdown von (A) JMJD1A oder (B) JMJD2A. XIII

Abb. A.2: α KGDH-Aktivität in Abhängigkeit des Inhibitors KMV XIII

Abb. A.3: Prozentualer Anteil an NAD(P)H (oben) und Membranpotenzial (unten) in BL/6J Mitochondrien unter Verwendung von Pyruvat/Malat (5 mM; links) oder α -Ketoglutarat (5 mM; rechts) als Substrat..... XIV

Abb. A.4: Netto Anstieg von NAD(P)H (A) und Membranpotenzial (B) in BL/6J Mitochondrien in Abhängigkeit der Substrate Pyruvat/Malat und α -Ketoglutarat und der Effektoren Rotenon und KMV aus Abbildung A.3..... XIV

Abb. A.5: Abhängigkeit von 10 μ M Amplex UltraRed zur gegebenen Menge an H₂O₂ bei einem Fluoreszenz Gain von 70 (= Versuchsbedingungen)..... XV

Abb. A.6: Sarkomerlänge, Zellverkürzung, Time to Peak und Relaxationszeiten der gemessenen Zellen aus Abbildung 31 zu den Zeitpunkten t = 60 s (NT 0,5 Hz), t = 120 s (Iso 0,5 Hz) und t = 300 s (Iso 5 Hz)..... XV

Abb. A.7: Erhöhter Sauerstoffverbrauch unter P/M (n = 4) und α KG (n = 2) in Mitochondrien, welche aus durch die Langendorff-Perfusion verdauten Herzen isoliert wurden XVI

Abb. A. 8: repräsentativer Wester Blot für die CoIP von HDAC4 und SUV39H1 von Abbildung 20 mit den Belichtungszeiten 4 Sekunden (links) und 2,5 Minuten (rechts) jeweils zur Detektion von Flag (oben) oder c-Myc (unten) XVI

IX. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Verwendete Oligonukleotide für die ChIP Assays aus neonatalen und adulten Rattenkardiomyozyten	26
Tab. 2: Auflistung der verwendeten siRNAs für knock-down Experimente in NRCM.	26
Tab. 3: Auflistung der verwendeten Antikörper sowie Zuordnung zu der entsprechenden Methode	27
Tab. 4: Verwendete TaqMan-Sonden zur Analyse der Genexpression	28

X. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Eigene Vorträge

- 13.04.2012: Rudi Busse Young Investigator Award im Rahmen der 78. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (Mannheim). Titel: „Upregulation of JmjC-domain containing histone demethylases contributes to ANP and BNP gene activation in human heart failure“. [2. Platz]
- 05.04.2013: Rudi Busse Young Investigator Award im Rahmen der 79. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (Mannheim). Titel: „Histone deacetylase 4 interaction with histone methyltransferase SUV39H1 is disrupted in response to prohypertrophic stimuli and controls ANP gene reactivation in heart failure“ [2. Platz]

Eigene Posterbeiträge

- 26.02.2012: Young Investigator Award im Rahmen des Heart Failure Winter Research Meeting (Les Diablerets). Titel: „Upregulation of JmjC-domain containing histone demethylases contributes to ANP and BNP gene activation in human heart failure“ (Autoren: M. Wagner, M. Hohl, M. Tauchnitz, A. M. Zimmer, M. Böhm, C. Maack)
- 11.10.2012: Basic Science Meeting im Rahmen der Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (Hamburg). Titel: Histone deacetylase 4 controls reactivation of ANP in heart failure by regulating rapid demethylation of H3K9“ (Autoren: M. Wagner, M. Hohl, J.-C. Reil, M. Tauchnitz, A. M. Zimmer, S.-A. Müller, J. Backs, M. Böhm & C. Maack)
- 24.01.2013: Young Investigator Award im Rahmen des Heart Failure Winter Research Meeting (Les Diablerets). Titel: „Histone deacetylase 4 controls reactivation of ANP in heart failure by regulating rapid demethylation of H3K9 through association with SUV39H1“ (Autoren: M. Wagner, M. Hohl, J.-C. Reil, M. Tauchnitz, A. M. Zimmer, L. Lehmann, M. Böhm, J. Backs, C. Maack)

- 08.10.2015: Basic Science Meeting im Rahmen der Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (Berlin). Titel: „The α -ketoglutarate dehydrogenase in cardiac mitochondria: source or “sink” of reactive oxygen species?“ (Autoren: M. Wagner, A. Nickel, M. Kohlhaas, C. Maack)
- 21.01.2016: Young Investigator Award im Rahmen des Heart Failure Winter Research Meeting (Les Diablerets). Titel: „The α -ketoglutarate dehydrogenase in cardiac mitochondria: source or “sink” of reactive oxygen species?“ (Autoren: M. Wagner, A. Nickel, M. Kohlhaas, G. E. Gibson, W. Heggermont, S. Heymans, C. Maack)
- 01.04.2016: 82. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (Mannheim). Titel: „The α -ketoglutarate dehydrogenase in cardiac mitochondria: source or “sink” of reactive oxygen species?“ (Autoren: M. Wagner, A. Nickel, M. Kohlhaas, G. E. Gibson, W. Heggermont, S. Heymans, C. Maack)

Publikationen

Hohl M, **Wagner M**, Reil JC, Müller SA, Tauchnitz M, Zimmer AM, Lehmann LH, Thiel G, Böhm M, Bacs J, Maack C (2013) HDAC4 controls histone methylation in response to elevated cardiac load. *Journal of Clinical Investigation* 123: 1359-1370

Beitrag: Alle Versuche zu den Abbildungen 6 und 10 sowie Teile der ChIP-PCRs von Maus und Mensch. Des Weiteren erstellen einzelner Teile des Manuskriptes.

Linz D, Hohl M, Nickel A, Mahfoud F, **Wagner M**, Ewen S, Schotten U, Maack C, Wirth K, Böhm M (2013) Effect of renal denervation on neurohumoral activation triggering atrial fibrillation in obstructive sleep apnea. *Hypertension* 62: 767-747

Beitrag: Durchführung und Auswertung von Realtime-PCRs zur Kontrolle der Genexpression verschiedener Hypertrophie- und Fibrosemarker im linken Ventrikel von Schweineherzen.

Nickel AG, von Hardenberg A, Hohl M, Löffler JR, Kohlhaas M, Becker J, Reil JC, Kazakov A, Bonnekoh J, Stadelmaier M, Puhl SL, **Wagner M**, Bogeski I, Cortassa S, Kappl R, Pasiaka B, Lafontaine M, Lancaster CR, Blacker TS, Hall AR, Duchon MR, Kästner L, Lipp P, Zeller T, Müller C, Knopp A, Laufs U, Böhm M, Hoth M, Maack C (2015) Reversal of Mitochondrial Transhydrogenase Causes Oxidative Stress in Heart Failure. *Cell Metabolism* 22: 472-484

Beitrag: Untersuchung der Expression von Genen in der Nähe von SNPs spezifisch für C57BL/6N verglichen mit C57BL/6J.

Puhl SL, Müller A, **Wagner M**, Devaux Y, Böhm M, Wagner DR, Maack C (2015) Exercise attenuates inflammation and limits scar thinning after myocardial infarction in mice. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 309: H345-H359

Beitrag: Durchführung von Realtime-PCRs für verschiedene Entzündungsmarker mit Proben aus Mäusen des Infarktmodells.

Wagner M, Nickel A, Kohlhaas M, Gibson GE, Heggermont W, Heymans S, Maack C (2016) geplante Publikation in *Cardiovascular Research* (in Bearbeitung)

Beitrag: Alle Versuchsdurchführungen (sofern nicht anders deklariert) sowie deren Auswertung und Erstellung des vorläufigen Manuskriptes.

DANKSAGUNG

Danksagungen sind beliebt beim Leser, aber weniger beim Schreiber, da man ja niemanden vergessen möchte. Für all diejenigen, die sich vergessen fühlen daher: Vielen Dank für eure individuelle Unterstützung und es tut mir Leid (ehrlich!).

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Böhm bedanken, der durch seinen Einsatz in der Anfangszeit diese Arbeit erst ermöglichte. Ferner gilt meine Dank Herrn Prof. Dr. Veit Flockerzi, der als Außenstehender ohne zu zögern die Rolle meines Doktorvaters und Erstberichterstatters übernommen hat, dazu wäre mit Sicherheit nicht bereit gewesen. Ebenfalls geht mein Dank an meinen Betreuer und Arbeitsgruppenleiter Herrn Prof. Dr. Christoph Maack, der stets ein offenes Ohr bei Problemen hatte und auch in schwierigen Zeiten immer an diese Arbeit geglaubt hat – selbst dann, wenn ich es vielleicht nicht mehr so tat. Zudem hat er die unglaubliche Gabe selbst scheinbar aussichtslose Situationen wieder möglich erscheinen zu lassen. Danke Christoph, dass du mich in deiner AG beheimatet hast.

Auf keinen Fall vergessen möchte unsere Kooperationspartner in Leuven, Herr Prof. Stéphane Heymans und Dr. Ward Heggermont, die uns mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Gary E. Gibson die DLST^{+/-}-Mäuse zur Verfügung stellten. Ebenso gilt mein Dank zuerst Prof. Dr. Johannes Backs und ebenso Dr. Lorenz Lehmann aus Heidelberg, die mich mehr als freundlich für eine Woche in ihren Laboratorien beherbergt hatten, um die Methoden der CoIP und der Immunfluoreszenz zu erlernen.

Ein weiterer Dank geht an die Mitglieder der kardiologischen Forschung, die jederzeit auch auf wirklich dumme Fragen eine hilfreiche Antwort hatten – sorry, dass ich oft so anstrengend war, aber ich denke, wir haben das trotzdem gut hingekriegt.

Ein besonderer Dank geht in dieser Hinsicht an die Mitglieder der Arbeitsgruppe Maack, die mir über die gesamte Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand: Danke an Dr. Alexander Nickel und Dr. Michael Kohlhaas für die ständige Diskussionsbereitschaft v.a. im zweiten Teil meiner Arbeit, als ich in ein Themenfeld „reingerutscht“ bin, mit dem ich eigentlich fast gar nicht vertraut war. Mein Dank geht auch an unsere TAs Michelle Gulentz und Nina Schnellbach für ihre Unterstützung bei den Versuchen mit den DLST-Mäusen, die mit einer Person in dieser Form nicht durchführbar gewesen wären. Aber auch Danke an diese Vier für die vielen Momente außerhalb des Labors, wir waren und sind ein herrlich verrückter Haufen und das kann nicht jeder von sich behaupten!

Ferner geht mein Dank auch an unsere ehemaligen Mitglieder Dr. Mathias Hohl (auch für meinen Spitznamen, ich möchte ihn nicht mehr missen!) und Lisa Lang, die im ersten Teil meiner Arbeit immer hilfreich an meiner Seite waren und mich in die geheimnisvolle Welt des Whisky eingeführt haben (wahrlich ein teures Hobby...aber es lohnt sich).

Ein großes Dankeschön geht natürlich an all meine Freunde, v.a. die Gruppe SchleFaZ (ihr wisst, wen ich meine), die immer ein offenes Ohr für Probleme in, um und außerhalb der Doktorarbeit hatten und alle fest daran glaubten, dass diese Arbeit zu einem gelungenen Abschluss kommt. Außerdem wird jeder noch so öde Fernsehabend ein absolutes Erlebnis mit euch. Ich kann mich mehr als glücklich schätzen, dass es euch gibt, ihr seid meine roten Kringel!

Nicht zuletzt geht mein Dank an meine zukünftige Schwiegerfamilie und meine eigene Familie, die mich immer motiviert haben. Ganz besonders danke ich natürlich meinen Eltern, ohne die ich zunächst gar nicht auf dieser Welt wäre und ohne deren permanente (auch finanzielle) Unterstützung alles nicht möglich gewesen wäre: Danke Mama, Danke Papa, ich hab euch lieb!

Viel mehr als nur mein Dank geht an meine Verlobte Sara: Danke, dass du Teil meines Lebens geworden bist und für immer bleibst und entschuldige, dass ich so lange gebraucht hab, um das zu kapieren.

Michael Wagner

Schaffhausen, im Juli 2016

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG (NACH §7, ABS. 1 NR. 4)

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung des vorangegangenen Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen unentgeltlich geholfen:

1. Dr. Mathias Hohl
2. D. Michael Kohlhaas
3. Dr. Alexander Nickel
4. Prof. Dr. Christoph Maack

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Ort, Datum

Unterschrift

LEBENS LAUF

In der elektronischen Version ist der Lebenslauf nicht beinhaltet.