

**Die Rolle der Topoisomerase 2 beta in der normalen  
Herzfunktion sowie in der Entstehung der  
Herzinsuffizienz**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Pharmazie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Isabelle Frensch

Mainz, 2014

Dekan:

1. Berichtstatter:

2. Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 10. November 2014

## Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum vom 15. Juli 2011 bis zum 24. Juli 2014 am Institut für Pharmakologie der Universitätsmedizin Mainz. Teile dieser Arbeit wurden bereits im Antrag auf inneruniversitäre Forschungsförderung durch Frau X aufgenommen, der für das Jahr 2014 genehmigt wurde.

Hiermit versichere ich, dass ich die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel (Literatur, Apparaturen, Material) in der Arbeit angegeben habe.

Mainz, 24. Juli 2014

Isabelle Frensch



# Inhaltsverzeichnis

|  |             |
|--|-------------|
| <b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>   | <b>III</b>  |
| <b>Inhaltsverzeichnis .....</b>  | <b>V</b>    |
| <b>Abbildungen .....</b>   | <b>IX</b>   |
| <b>Tabellenverzeichnis .....</b>   | <b>XI</b>   |
| <b>Zusammenfassung.....</b>  | <b>XIII</b> |
| <b>Abstract.....</b>   | <b>XV</b>   |
| <b>1. Einleitung .....</b>   | <b>1</b>    |
| <b>1.1 Topoisomerasen .....</b>  | <b>1</b>    |
| 1.1.1 Struktur der Topoisomerase 2 .....   | 1           |
| 1.1.2 Isoformen der Topoisomerase 2 und ihre Expression .....  | 1           |
| 1.1.3 Katalytische Funktion der Top2b-Enzyme in biologischen Prozessen.....  | 2           |
| 1.1.3.1 Beteiligung der Top2b an der Transkription.....  | 3           |
| 1.1.4 Topoisomerase als wichtiges Zielmolekül für Arzneimittel .....   | 4           |
| 1.1.5 Pharmakologisch induzierte Top2b-Hemmung führt zur Herzinsuffizienz.....   | 5           |
| 1.1.6 Genetisch induzierte Top2b-Deletion führt zu einem letalen Phänotyp und geht mit Genexpressionsänderungen einher ..... | 6           |
| 1.1.6.1 Phänotypische Ausprägung einer konstitutiven homozygoten Top2b-Deletion.....   | 6           |
| 1.1.6.2 Genexpressionsänderungen nach einer konstitutiven homozygoten Top2b-Deletion.....                                    | 6           |
| 1.1.6.3 Zusammenfassung .....  | 7           |
| <b>1.2 Die Herzinsuffizienz.....</b>   | <b>8</b>    |
| 1.2.1 Allgemeines und Definition .....   | 8           |
| 1.2.2 Klassifizierung.....   | 9           |
| 1.2.3 Epidemiologie.....   | 9           |
| 1.2.4 Ätiologie.....   | 10          |
| 1.2.5 Pathophysiologie.....  | 10          |
| 1.2.5.1 Aufbau des Interstitiums und fibrotische Veränderungen .....   | 12          |
| 1.2.6 Diagnostik .....   | 14          |
| 1.2.7 Behandlung.....  | 15          |
| <b>1.3 Ziel dieser Arbeit: Die Rolle der Top2b im Herzen.....</b>  | <b>16</b>   |
| <b>2. Material und Methoden .....</b>  | <b>18</b>   |
| <b>2.1 Puffer und Lösungen .....</b>   | <b>18</b>   |
| <b>2.2 Primersequenzen.....</b>  | <b>22</b>   |
| <b>2.3 Tierversuch .....</b>   | <b>24</b>   |
| 2.3.1 Mausstamm .....  | 24          |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 2.3.2      | Zuchtschemata .....  | 25        |
| 2.3.2.1    | Zuchtschemata der Rückkreuzung zu Cre <sup>+</sup> WT-Tieren .....   | 27        |
| 2.3.3      | Genotypisierung auf Cre-Rekombinase, LoxP und Wildtyp .....  | 27        |
| 2.3.4      | Tamoxifen induzierte Deletion der Top2b in Kardiomyozyten.....   | 29        |
| 2.3.5      | Isolation von Kardiomyozyten.....  | 30        |
| <b>2.4</b> | <b>Molekularbiologische Methoden.....</b>  | <b>31</b> |
| 2.4.1      | DNA-Extraktion.....  | 31        |
| 2.4.1.1    | Qualitativer Nachweis der Deletion .....   | 31        |
| 2.4.1.2    | Quantitativer Nachweis der Deletion .....  | 32        |
| 2.4.2      | RNA-Extraktion .....   | 32        |
| 2.4.3      | Reverse Transkription für quantitative PCR.....  | 33        |
| 2.4.4      | Quantitative PCR.....  | 33        |
| 2.4.5      | Quantifizierung der Ergebnisse.....  | 34        |
| 2.4.6      | Proteinexpression und Quantifizierung mittels Western Blot .....   | 35        |
| 2.4.6.1    | Probenvorbereitung .....   | 35        |
| 2.4.6.2    | Proteinbestimmung mittels BCA-Assay.....   | 35        |
| 2.4.6.3    | SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) und<br>Tankblot.....                                  | 35        |
| 2.4.6.4    | Antikörperinkubation und Detektion.....  | 36        |
| 2.4.6.5    | Quantifizierung der Top2b-Proteinmenge .....   | 36        |
| <b>2.5</b> | <b>Kardiomyozytäre Transkriptomanalyse mittels<br/>Hochdurchsatz-Sequenzierung .....</b>                             | <b>37</b> |
| 2.5.1      | Bioinformatische Datenanalyse der RNA-seq Daten .....  | 37        |
| 2.5.1.1    | Qualitätskontrolle .....   | 37        |
| 2.5.1.2    | Trimmen: Entfernen von Sequenzabschnitten.....   | 37        |
| 2.5.1.3    | Mapping: Sequenzalignierung an das Genom .....   | 38        |
| 2.5.1.4    | Cufflinks: Ermittlung der Expressionsstärke.....   | 38        |
| 2.5.1.5    | Cuffdiff: Identifizierung differentiell exprimierter Gene .....  | 38        |
| <b>2.6</b> | <b>Analyse der Top2b-DNA-Bindung mittels Chromatin-Immunpräzipitation<br/>(ChIP) .....</b>                           | <b>39</b> |
| 2.6.1      | Crosslink und Sonifizierung .....  | 39        |
| 2.6.2      | Kontrolle der DNA-Fragmentgröße .....  | 40        |
| 2.6.3      | Immunpräzipitation .....   | 40        |
| 2.6.3.1    | Preclearing und Präzipitation.....   | 40        |
| 2.6.3.2    | Waschen des DNA-Protein-Antikörpergemisches und Trennung des Komplexes<br>vom Antikörper .....                       | 41        |
| 2.6.3.3    | Reverse Crosslink und Fällung der DNA .....  | 42        |
| 2.6.4      | Herstellung der Proben für die Sequenzierung .....   | 42        |
| 2.6.4.1    | Qubit®- Messungen, DNA-Fragmentlängenbestimmungen und Chromatin-<br>Immunpräzipitationssequenzierung (ChIP-seq)..... | 43        |
| 2.6.5      | Bioinformatische Datenanalyse von ChIP-seq Daten .....   | 43        |
| 2.6.5.1    | Qualitätskontrolle .....   | 43        |
| 2.6.5.2    | Trimmen: Entfernen von Sequenzabschnitten.....   | 43        |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 2.6.5.3    | Mapping: Sequenzalignierung an das Genom.....   | 44        |
| 2.6.5.4    | Findung von Peaks und Annotation.....   | 44        |
| 2.6.6      | ChIP-qPCR.....  | 46        |
| <b>2.7</b> | <b>Funktionelle Untersuchung der deletierten Tiere.....</b>   | <b>46</b> |
| 2.7.1      | Magnetresonanztomographie .....   | 46        |
| 2.7.2      | Echokardiographie .....   | 47        |
| <b>2.8</b> | <b>Histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen.....</b>   | <b>48</b> |
| 2.8.1      | Histologische Untersuchungen an Paraffinschnitten .....   | 48        |
| 2.8.1.1    | Probenvorbereitung .....  | 48        |
| 2.8.1.2    | Fixierung und Einbetten der Proben .....  | 49        |
| 2.8.1.3    | Anfertigung histologischer Schnitte .....   | 50        |
| 2.8.1.4    | H&E-Färbung .....   | 50        |
| 2.8.1.5    | Masson-Goldner-Färbung .....  | 50        |
| 2.8.1.6    | Elastika-van-Gieson-Färbung nach Hansen .....   | 51        |
| 2.8.2      | Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....  | 51        |
| 2.8.2.1    | Aufbereitung, Fixierung und Einbettung der Gewebestücke.....  | 52        |
| 2.8.2.2    | Schneiden der Präparate und elektronenmikroskopische Untersuchungen .....   | 52        |
| <b>2.9</b> | <b>Statistische Auswertungen.....</b>   | <b>52</b> |
| <b>3.</b>  | <b>Ergebnisse.....</b>  | <b>54</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Genotypisierung transgener Tiere .....</b>   | <b>54</b> |
| <b>3.2</b> | <b>Tamoxifen induzierte Deletion der Top2b .....</b>  | <b>55</b> |
| 3.2.1      | Deletion auf mRNA-Ebene .....   | 56        |
| 3.2.2      | Deletion auf DNA-Ebene .....  | 57        |
| 3.2.2.1    | Qualitativer Nachweis.....  | 57        |
| 3.2.2.2    | Quantitativer Nachweis.....   | 58        |
| 3.2.3      | Deletion auf Protein-Ebene .....  | 59        |
| <b>3.3</b> | <b>Manifestierte Kardiomyopathie nach Deletion der Top2b.....</b>   | <b>62</b> |
| 3.3.1      | Verschlechterte Herzfunktion nach Top2b-Deletion<br>(Magnetresonanztomographie).....  | 62        |
| 3.3.2      | Verschlechterte Herzfunktion nach Top2b-Deletion (Echokardiographie) .....  | 65        |
| 3.3.3      | Signifikante Expressionssteigerung von Genen, involviert in der<br>Herzinsuffizienz.....                                    | 69        |
| <b>3.4</b> | <b>Deutliche fibrotische Akkumulationen im Herzgewebe<br/>nach Top2b-Deletion.....</b>                                      | <b>71</b> |
| 3.4.1      | Sechsfache Steigerung des Bindegewebes in Top2b-deletierten Tieren<br>8 Wochen nach der Implementierung des Knockouts ..... | 74        |
| 3.4.2      | Verifizierung der vorhandenen kollagenen Ausbreitungen anhand quantitativer<br>Expressionsanalysen .....                    | 76        |
| 3.4.3      | Fibrotische Ansammlungen in Top2b-deletierten Tieren<br>(Elektronenmikroskopie).....  | 79        |
| <b>3.5</b> | <b>Manifestierte Kardiomyopathie: nur ein Cre-Effekt?.....</b>  | <b>81</b> |
| <b>3.6</b> | <b>Der genomweite Umfang der differentiell exprimierten Gene</b>  |           |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
|            | <b>nach einer Top2b-Deletion.....</b>   | <b>82</b>  |
| <b>3.7</b> | <b>Der genomweite Umfang der Top2b-Bindungscharakteristika mittels Chromatin-Immunpräzipitationssequenzierung (ChIP-seq).....</b> | <b>86</b>  |
| 3.7.1      | Kontrolle des Versuchsprotokolls .....  | 86         |
| 3.7.2      | Genomweite Untersuchung der Top2b-Bindungsstellen.....  | 88         |
| 3.7.2.1    | Verifizierung der ChIP-seq Daten mittels ChIP-qPCR .....  | 91         |
| <b>3.8</b> | <b>P53 ist involviert in transkriptionellen Veränderungen nach einer Top2b-Deletion.....</b>                                      | <b>93</b>  |
| 3.8.1      | Gesteigerte p53-Bindung an Promotorbereichen ausgewählter Gene 8 Wochen nach Top2b-Deletion.....                                  | 93         |
| <b>4.</b>  | <b>Diskussion .....</b>   | <b>95</b>  |
| <b>4.1</b> | <b>Die Top2b ist essentiell zur Aufrechterhaltung der normalen Herzfunktions-Homöostase.....</b>                                  | <b>95</b>  |
| 4.1.1      | Eine genetische Top2b-Deletion führt zu funktionellen Verschlechterungen des Herzens .....  | 95         |
| 4.1.2      | Fibrotische Veränderungen nach einer Top2b-Deletion .....   | 97         |
| 4.1.3      | Genexpressionsveränderungen nach einer Top2b-Deletion .....   | 98         |
| 4.1.3.1    | Genexpressionsveränderung der natriuretischen Peptide ANP und BNP .....   | 99         |
| 4.1.3.2    | Genexpressionsveränderung fibrotischer Marker .....   | 100        |
| 4.1.4      | Genetische Top2b-Deletion mündet in eine dilatative Kardiomyopathie und geht mit Genexpressionsveränderungen einher .....         | 102        |
| 4.1.4.1    | Die entstandene dilatative Kardiomyopathie ist kein Cre-Effekt .....  | 103        |
| <b>4.2</b> | <b>Die Rolle der Top2b in der Entstehung der Herzinsuffizienz.....</b>  | <b>104</b> |
| 4.2.1.1    | Die Aktivierung von p53 steht in Zusammenhang mit einer Top2b-Deletion ...  | 104        |
| 4.2.1.2    | Die Aktivierung von p53 steht in Zusammenhang mit einer DOX induzierten Top2b-Hemmung .....                                       | 108        |
| 4.2.1.3    | Spielt eine nahrungsvermittelte Top2b-Inhibition eine Rolle in der Entstehung der Herzinsuffizienz? .....                         | 109        |
| <b>4.3</b> | <b>Die Rolle der Top2b in der Transkription.....</b>  | <b>110</b> |
| <b>5.</b>  | <b>Literaturverzeichnis .....</b>   | <b>113</b> |
| <b>6.</b>  | <b>Anhang.....</b>  | <b>122</b> |
|            | <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>  | <b>132</b> |
|            | <b>Danksagung .....</b>   | <b>135</b> |
|            | <b>Curriculum Vitae .....</b>   | <b>136</b> |



# Abbildungen

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1.1 Modell für die katalytische Reaktion der Topoisomerase, modifiziert (Berger et al., 1996) .....                                     | 3  |
| Abbildung 1.2 Molekularer Mechanismus der Top2b/PARP-1 abhängigen regulierten Gentranskription (Ju et al., 2006) .....                            | 4  |
| Abbildung 1.3 Chromatin-Immunpräzipitationsanalysen von Top2b an Top2b-sensitiven Genen an ausgewählten Promotorregionen (Lyu et al., 2006) ..... | 7  |
| Abbildung 1.4 Zusammenfassung der Effekte einer genetischen und pharmakologischen Top2b-Hemmung .....   | 8  |
| Abbildung 1.5 Circulus vitiosus der chronischen Herzinsuffizienz (Weil and Schunkert, 2006) .....   | 12 |
| Abbildung 2.1 Die spezifische konditionelle TAM-induzierte Deletion der Top2b in Kardiomyozyten .....   | 25 |
| Abbildung 2.2 Zuchtschemata zur Generierung der geflochten Cre <sup>+</sup> - und Cre <sup>-</sup> -Tiere .....                                   | 26 |
| Abbildung 2.3 Zuchtschemata zur Generierung von Cre-Rekombinase-tragenden ungeflochten Kontrolltieren .....                                       | 27 |
| Abbildung 2.4 Darstellung der Primerlokalisierung nach Lyu et al. (Lyu and Wang, 2003) .....  | 31 |
| Abbildung 2.5 Übersichtsschema zur Herstellung der DNA-Proben für die genomweite Sequenzierung .....  | 42 |
| Abbildung 2.6 Schema der bioinformatischen Datenanalyse der ChIP-seq Daten .....  | 45 |
| Abbildung 2.7 Bruker Pharmascan 7.0 T MRT- Scanner für Kleintiere (MPI Bad Nauheim) .....   | 47 |
| Abbildung 3.1 Gelelektrophoretische Darstellung der Genotypisierungs-PCR: LoxP und WT .....   | 54 |
| Abbildung 3.2 Gelelektrophoretische Darstellung der Genotypisierungs-PCR: Cre-Rekombinase .....   | 55 |
| Abbildung 3.3 Zeitverlauf des TAM-induzierten Knockouts .....   | 56 |
| Abbildung 3.4 Top2b mRNA-Expression nach TAM-induzierter Top2b-Deletion bezogen auf Cre <sup>-</sup> -Mäuse .....                                 | 57 |
| Abbildung 3.5 Gelelektrophoretische Darstellung zur qualitativen Detektion der Top2b-Deletion .....   | 58 |
| Abbildung 3.6 Nicht rekombinierte Top2b-Allele bezogen auf Cre <sup>-</sup> -Mäuse .....  | 59 |
| Abbildung 3.7 Top2b-Proteinexpression von Top2b-deletierten und nichtdeletierten Tieren .....   | 60 |
| Abbildung 3.8 Relative Expressionsänderung von Top2b-Protein nach TAM-induzierter Deletion bezogen auf GAPDH .....                                | 61 |

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 3.9 Top2b-Proteinexpression von Top2b-deletierten und nichtdeletierten Tieren.....  | 62 |
| Abbildung 3.10 Schematische Darstellung des Versuchsverlaufs der magnetresonanztomographischen (MRT) Untersuchungen .....   | 63 |
| Abbildung 3.11 MRT-Untersuchung der kardialen Funktion.....   | 64 |
| Abbildung 3.12 Schematische Darstellung des Versuchsverlaufs der echokardiographischen (Echo) Untersuchungen .....  | 65 |
| Abbildung 3.13 Echokardiographische Untersuchung der kardialen Funktion.....  | 68 |
| Abbildung 3.14 Genexpressionsveränderungen von ANP und BNP in Top2b-deletierten Tieren und nichtdeletierten Kontrolltieren .....  | 70 |
| Abbildung 3.15 Repräsentative histologische Bilder der interstitiellen Fibrose (von Top2b-deletierten Tieren) dargestellt in H&E-, Masson-Goldner- und Elastika-van-Gieson-Färbungen..... | 72 |
| Abbildung 3.16 Repräsentative EVG-gefärbte Bilder der interstitiellen fibrotischen Progression zu den Zeitpunkten 0 und 8 Wochen.....   | 73 |
| Abbildung 3.17 Darstellung zur Quantifizierung fibrotischer Areale in Top2b-deletierten Tieren zu den Zeitpunkten 0 und 8 Wochen.....   | 75 |
| Abbildung 3.18 Semiquantitative Auswertung fibrotischer Areale in EVG-gefärbten Schnitten von Top2b-deletierten Tieren im Vergleich zu nichtdeletierten Kontrolltieren.....               | 76 |
| Abbildung 3.19 Genexpressionsveränderungen von Col1a1, Col3a1, Tgfβ2 und Tgfβ1 in Top2b-deletierten Tieren und nichtdeletierten Kontrolltieren.....                                       | 78 |
| Abbildung 3.20 Elektronenmikroskopische Untersuchungen in Top2b-deletierten und nichtdeletierten Kontrolltieren 8 Wochen nach Knockout-Induktion.....                                     | 81 |
| Abbildung 3.21 Genexpressionsveränderungen von ANP, Col1a1 und Tgfβ2 in Cre <sup>-</sup> und Cre <sup>+</sup> -Tieren im Vergleich zu Cre-Rekombinase-tragenden Kontrolltieren.....       | 82 |
| Abbildung 3.22 Anzahl der signifikant differentiell exprimierten Gene 12 Tage nach der Top2b-Deletion .....   | 83 |
| Abbildung 3.23 Interaktion der Transkriptionsfaktoren ermittelt mit STRING.....   | 86 |
| Abbildung 3.24 Bindung des H3K4me3-Antikörpers an Histone in drei verschiedenen Promotorregionen des KChIP-Gens.....  | 87 |
| Abbildung 3.25 Zuordnung der Top2b-Bindungsstellen an Transkriptionsstartpunkte aller Gene des Mausgenoms .....   | 89 |
| Abbildung 3.26 Top2b-Bindungsmuster .....   | 90 |
| Abbildung 3.27 Visualisierung der Top2b-Bindungsstellen mittels IGV .....   | 92 |
| Abbildung 3.28 Bindung von Top2b an ausgewählte Gene .....  | 92 |
| Abbildung 3.29 Bindung von p53 an Promotorregionen ausgewählter Gene mittels ChIP-qPCR.....   | 94 |

# Tabellenverzeichnis

|   |     |
|---|-----|
| Tabelle 1.1 Klassifizierung der Herzinsuffizienz nach der New York Heart Association (NYHA) (Hoppe et al., 2005).....                         | 9   |
| Tabelle 1.2 Klassifizierung der Herzinsuffizienz nach der American Heart Association (AHA) (Hunt et al., 2009).....                           | 9   |
| Tabelle 1.3 Ursachen der Herzinsuffizienz (McMurray et al., 2012).....  | 10  |
| Tabelle 1.4 Typische Symptome und klinische Zeichen einer Herzinsuffizienz .....  | 14  |
| Tabelle 2.1 Verwendete Puffer und Lösungen .....  | 18  |
| Tabelle 2.2 Primersequenzen.....  | 22  |
| Tabelle 2.3 Pipettierschema zur Durchführung der Genotypisierung der Cre- Rekombinase, der LoxP-Seiten und des Top2b WT-Allels.....           | 28  |
| Tabelle 2.4 Pipettierschema zur qualitativen Detektion der Top2 Deletion auf DNA-Ebene .....  | 32  |
| Tabelle 2.5 Sybr Green Assay .....  | 32  |
| Tabelle 2.6 Pipettierschema des TaqMan-Assays zur quantitativen mRNA-Expressionsanalyse .....   | 34  |
| Tabelle 2.7 Pipettierschema des Sybr Green Assays von Quantas.....  | 34  |
| Tabelle 2.8 Einbettprogramm 2 des Einbettautomats (Sakura).....   | 49  |
| Tabelle 3.1 FPKM-Werte und vergleichende Genexpressionsveränderungen des Top2b-Genes in RNA-seq und qPCR-Experimenten.....                    | 84  |
| Tabelle 3.2 Analyse von differentiell regulierten Signalwegen .....   | 84  |
| Tabelle 3.3 Anzahl der Sequenzfragmente der ChIP-seq pro Sequenzierrichtung .....   | 88  |
| Tabelle 3.4 Gene mit der höchsten Wahrscheinlichkeit einer Top2b-Bindung .....  | 91  |
| Tabelle 3.5 22 differentiell exprimierte Gene .....   | 93  |
| Tabelle 6.1 Anzahl der Reads sowie detektierte Gene bei der RNA Hochdurchsatz-Sequenzierung und Anzahl der signifikant veränderten Gene ..... | 122 |
| Tabelle 6.2 Signifikant veränderte Gene mit einer mindestens 2-fachen Expressionssteigerung (RNA Hochdurchsatz-Sequenzierung).....            | 122 |
| Tabelle 6.3 Bestimmung der Top2b-Deletion: Anzahl der verwendeten Tiere, Mittelwert, SD sowie SEM .....                                       | 124 |
| Tabelle 6.4 MRT: Anzahl der verwendeten Tiere, Mittelwert, SD sowie SEM .....   | 124 |
| Tabelle 6.5 Echokardiographie: Anzahl der verwendeten Tiere, Mittelwert, SD sowie SEM .....   | 125 |
| Tabelle 6.6 Expressionsänderung von ANP und BNP: Anzahl der verwendeten Tiere, Mittelwert, SD sowie SEM .....                                 | 127 |
| Tabelle 6.7 quantitative Fibroseauswertung: Anzahl der verwendeten Tiere, Mittelwert, SD sowie SEM .....                                      | 128 |

---

|  |     |
|--|-----|
| Tabelle 6.8 Expressionsänderung von Col1a1, Col3a1, Tgfβ1 und Tgfβ2: Anzahl der<br>verwendeten Tiere, Mittelwert, SD sowie SEM ..... | 128 |
| Tabelle 6.9 Kontrollexperiment: Anzahl der verwendeten Tiere,<br>Mittelwert, SD sowie SEM.....                                       | 130 |
| Tabelle 6.10 ChIP-seq Sequenzfragmente und Bindungsstellen .....   | 130 |
| Tabelle 6.11 Chromatin-Immunpräzipitation Top2b: Anzahl der verwendeten Tiere,<br>Mittelwert, SD sowie SEM.....                      | 131 |
| Tabelle 6.12 Chromatin-Immunpräzipitation p53: Anzahl der verwendeten Tiere,<br>Mittelwert, SD sowie SEM.....                        | 131 |

## Zusammenfassung

Die Herzinsuffizienz (HI) ist eine der häufigsten und teuersten medizinischen Indikationen in der heutigen Zeit. Die Ursachen sind zahlreich und umfassen kardiovaskuläre Erkrankungen wie die koronare Herzerkrankung, den Hypertonus oder die dilatative Kardiomyopathie.

In den westlichen Ländern leiden rund 1 - 2% der erwachsenen Bevölkerung an einer Herzinsuffizienz.

Trotz des therapeutischen Fortschritts wie der Blockade der Beta-Rezeptoren, der Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems oder auch des Einsatzes von Kardioverter-Defibrillatoren verstirbt immer noch jeder zweite Patient innerhalb von fünf Jahren, was der Mortalitätsrate von Krebserkrankungen entspricht. Aus diesem Grund gilt es alternative Behandlungsmöglichkeiten zu finden und ein besseres Verständnis der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz zu entwickeln.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal die Topoisomerase 2b (Top2b) in Zusammenhang mit der Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie gebracht werden. Durch die Generierung transienter DNA-Strangbrüche sind Topoisomerasen in der Lage superhelikalen Stress, der bei Transkription, Replikation, Rekombination und DNA-Reparatur auftritt, aufzuheben.

Die Top2b ist hauptsächlich in postmitotischen Zellen (wie z. B. Kardiomyozyten) exprimiert. In einem speziellen Mausmodell war es möglich, die Top2b gewebspezifisch und zeitspezifisch nur in Kardiomyozyten zu deletieren. Dies geschah mittels eines Tamoxifen-induzierten Cre-Rekombinase-Gendeletionsmodells. Phänotypisch zeigten die Top2b-deletierten Mäuse 8 Wochen nach der Tamoxifen-Gabe signifikant reduzierte kardiale Ejektionsfraktionen sowie erhöhte linksventrikuläre enddiastolische und endsystolische Volumina sowohl in magnetresonanztomographischen als auch in echokardiographischen Untersuchungen. Weder Schlagvolumen noch Körpergewicht waren verändert. Die natriuretischen Peptide ANP und BNP waren in den Top2b-deletierten Tieren ebenfalls signifikant erhöht. Neben funktionellen Verschlechterungen konnten auch morphologische Veränderungen beobachtet werden. Sowohl elektronenmikroskopische Untersuchungen als auch klassische histologische Verfahren wie Masson-Golder- und Elastika-van-Gieson-Färbungen zeigten fibrotische Veränderungen und erhöhte Kollagenablagerungen in Top2b-deletierten Tieren. In einer semiquantitativen Fibroseauswertung konnte zusätzlich eine 6-fache Steigerung fibröser Areale in den Top2b-deletierten Tieren 8 Wochen nach Tamoxifen-Gabe nachgewiesen

werden. Begleitend dazu stiegen die mRNA-Expressionslevel von Col1a1, Col3a1, Tgfβ1 und Tgfβ2 in den deletierten Tieren 8 Wochen nach der Implementierung der Deletion signifikant an.

In einer genomweiten Hochdurchsatz-Sequenzierung waren bereits 2 Wochen nach Tamoxifen-Gabe 128 Gene mindestens 2-fach gegenüber der Kontrollgruppe differentiell exprimiert. Von diesen Genen waren 91 hochreguliert, wobei 61 davon 2- bis 4-fach und 30 Gene sogar mehr als 4-fach gesteigert waren. Es konnten 37 Gene detektiert werden, deren Expressionsänderung zwischen 2- bis 4-fach vermindert war. Eine genauere Analyse der veränderten Genexpression ließ somit bereits 14 Tage nach Implementierung der Deletion kardiale Verschlechterungen vermuten. So waren neben dem atrialen natriuretischen Peptid ANP die beiden häufigsten Kollagenarten im Herzen, Col3a1 und Col1a1, hochreguliert. Die mRNA-Expression von Entzündungsmediatoren wie Cd24a und CD44 war ebenfalls erhöht.

Interessanterweise beinhalteten die 37 herunterregulierten Gene 11 Transkriptionsfaktoren (u. a. Fos, Egr1, Fosb, Snai3), die miteinander zu interagieren scheinen. Da der Top2b in den letzten Jahren eine immer stärker werdende Bedeutung in der Transkription zugesprochen wird, stellte sich entsprechend die Frage, ob es einen direkten Zusammenhang zwischen der Top2b-Deletion und der Herunterregulierung der 11 Transkriptionsfaktoren gibt. Diese Hypothese sollte mittels einer Chromatin-Immunpräzipitation geklärt werden, in der die Bindung der Top2b an Promotoren ausgewählter, differentiell-exprimierter Gene untersucht werden sollte. In den durchgeführten Untersuchungen konnte generell keine vermehrte Bindung von Top2b an Promotorbereiche gezeigt werden, was aber nicht dem generellen Fehlen einer Bindung gleichkommen muss. Vielmehr gab es methodische Schwierigkeiten, weshalb die Bedeutung der Top2b in der Transkription im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht ausreichend geklärt werden konnte.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Kardiomyozyten-spezifische Top2b-Deletion 8 Wochen nach Tamoxifen-Gabe in eine dilatative Kardiomyopathie mündet. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind keine klaren Aussagen zum zugrundeliegenden Mechanismus der entstehenden Herzschädigung in Folge einer Top2b-Deletion zu treffen. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass der Tumorsuppressormarker p53 eine wichtige Rolle in der Entstehung der dilatativen Kardiomyopathie spielen könnte. So konnte 8 Wochen nach der Top2b-Deletion mittels Chromatin-Immunpräzipitation eine erhöhte Bindung von p53 an Promotorregionen von Col1a1, Tgfβ2 und Mmp2 detektiert werden. Die Bedeutung dieser Bindung, und ob aufgrund dessen die Entstehung der Fibrose erklärt werden könnte, ist zum jetzigen Zeitpunkt unklar.

## Abstract

Heart failure is currently one of the most common and most expensive medical indications. The causes are numerous and include population ageing, improved survival of patients with coronary heart diseases, increasing prevalence of hypertension, diabetes, and dilated cardiomyopathy.

In the western countries around 1 - 2% of the adult population suffer from heart failure.

Despite the therapeutic progress such as the blockade of beta-receptors, the inhibition of the renin-angiotensin-aldosterone-system or the use of cardioverter defibrillators every second patient dies within five years, which is comparable to the mortality from cancer. For this reason it is important to find alternative treatments and to develop a better understanding of the pathophysiology of heart failure.

We demonstrate for the first time that topoisomerase 2b (Top2b) is associated with the development of dilated cardiomyopathy. Through the generation of transient DNA strand breaks, topoisomerases resolve superhelical stress that occurs during transcription, replication, recombination, and DNA-repair.

Top2b is expressed mainly in postmitotic cells (e. g. cardiomyocytes). In a special mouse model, Top2b was deleted exclusively in cardiomyocytes through tamoxifen-induced Cre-recombinase. Top2b-deleted mice showed significantly reduced ejection fraction values and significantly increased left ventricular enddiastolic and endsystolic volumes in MRI and echocardiographic studies 8 weeks after tamoxifen administration. Stroke volume and body weight remained unchanged. The natriuretic peptides ANP and BNP were significantly increased in Top2b-deleted mice. In addition to functional impairments, morphological changes were observed. Fibrotic changes and increased collagen depositions were detected in Top2b-deleted mice both by electron microscopy and by classical histological methods such as Masson-Goldner and Elastika-van-Gieson staining. In a semi-quantitative fibrosis evaluation, a 6-fold increase of fibrotic areas was detected in Top2b-deleted mice 8 weeks after tamoxifen administration. Consistently, mRNA expression levels of Col1a1, Col3a1, Tgf $\beta$ 1 and Tgf $\beta$ 2 increased significantly in deleted mice 8 weeks after Top2b deletion.

In a genome-wide RNA analysis 128 genes were at least 2-fold differentially expressed compared to the control group 2 weeks after tamoxifen administration. Of these genes 91 were upregulated, with 61 of them between 2- and 4-fold; 30 genes were more than 4-fold increased. 37 genes were 2- to 4-fold down-regulated. Upon a more detailed analysis of

altered gene expression, cardiac impairments were assumed 14 days after Top2b-deletion. ANP and the most common types of collagens in the heart Col1a1 and Col3a1 were also up-regulated. In addition the mRNA expression of inflammatory mediators such as Cd24a and CD44 was also increased.

Interestingly, 11 transcription factors (including Fos, Egr1, Fosb, Snai3) among the 37 down-regulated genes appear to interact with each other. The relationship between the Top2b deletion and the down-regulation of the 11 transcriptional factors was examined by means of a chromatin immunoprecipitation of Top2b bound to promoters of selected differentially expressed genes. No increased binding of Top2b to promoter regions was detected, but this may have been caused by analytical difficulties. Therefore, the importance of Top2b in the transcription has not been clarified in the present work.

In summary, a cardiomyocyte-specific Top2b deletion leads to a dilated cardiomyopathy, which is described and characterized in the present work. The underlying mechanism remains to be clarified. The tumor suppressor marker p53 plays an important role in the development of the dilated cardiomyopathy. In this context, an increased binding of p53 to promoter regions of Col1a1, Tgf $\beta$ 2 and Mmp2 was detected in Top2b deleted mice 8 weeks after deletion implementation. The importance of this binding for the development of fibrosis and dilated cardiomyopathy is under investigation.



# 1. Einleitung

## 1.1 Topoisomerasen

Transkription, Replikation, Rekombination und DNA-Reparatur führen zu superhelikalem Stress (Collins *et al.*, 2001). Topoisomerasen sind Enzyme, die durch die Generierung von transienten DNA-Strangbrüchen diese topologischen Schwierigkeiten aufheben können (Nitiss, 2009). Je nach ihrer Funktion wird zwischen Topoisomerasen vom Typ I (Top1), die Einzelstrangbrüche einführen und Topoisomerasen vom Typ II (Top2) unterschieden, welche Doppelstrangbrüche induzieren (Champoux, 2001).

### 1.1.1 Struktur der Topoisomerase 2

Die Topoisomerase 2 ist ein großes homodimeres Enzym, wobei jedes Monomer aus drei verschiedenen funktionellen Abschnitten besteht, einer Stickstoff-terminalen (N-terminalen) Domäne, einer zentralen und einer Carboxy-terminalen (C-terminalen) Domäne (Nitiss, 2009). Während die N-terminale Domäne die ATP-Bindungsstelle trägt, beinhaltet die zentrale Domäne das aktive Zentrum des Enzyms sowie die Topoisomerase-Primase (TOPRIM), die durch die Komplexierung von divalenten Kationen essentiell für die Ausbildung von DNA-Strangbrüchen ist (Nitiss, 2009). Die C-terminale Domäne ist höchstwahrscheinlich sowohl für die Regulation der Enzymaktivität als auch für die Enzymfunktion bei Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich (Nitiss, 2009). Sie ist im Unterschied zu N-Terminus und zentralem Bereich nicht über Isoformen oder Spezies hinweg konserviert (Nitiss, 2009; Vavrova and Simunek, 2012).

### 1.1.2 Isoformen der Topoisomerase 2 und ihre Expression

In Säugetieren werden zwei Isoformen der Top2 exprimiert, die Topoisomerase 2a (**Top2a**) und die Topoisomerase 2b (**Top2b**) (Nitiss, 2009).

Die beiden Isoformen unterscheiden sich in ihrer molaren Masse von 172 kDa für die Top2a und 180 kDa für die Top2b (Austin and Marsh, 1998). Der Größenunterschied ergibt sich aus der Länge und Zusammensetzung der Proteinsequenz (Top2b: 1.621 bp; Top2a: 1531 bp) (Austin and Marsh, 1998).

Die Aminosäuresequenzen von Top2a und Top2b stimmen zu 68% überein, vor allem aufgrund der Konservierung in der N-terminalen Domäne (Austin and Marsh, 1998). Es ist davon auszugehen, dass die beiden Isoformen aus einer Genduplikation entstanden sind

(Vavrova and Simunek, 2012). Die Top2b besitzt eine 95%ige Konservierung der Proteinsequenz zwischen Mensch, Maus und Hamster (Austin and Marsh, 1998).

Die Expression von Top2a ist Zellzyklus abhängig, was ihre Gewebesdistribution erklärt. In der S- und G<sub>0</sub>-Phase ist die Top2a niedrig exprimiert; ihren Expressionshöhepunkt erreicht sie in der G<sub>2</sub>-M-Phase (Vavrova and Simunek, 2012; Vejpongsa and Yeh, 2014). Demnach ist sie vor allem in Gewebe mit proliferierenden Zellen exprimiert, wobei die Expression besonders hoch in Thymus, Milz und Knochenmark ist. In Darm, Magen und Hoden kommt die Top2a in einem geringeren Ausmaß vor, in nicht-teilungsaktiven Zellen hingegen gar nicht (Capranico *et al.*, 1992; Nitiss, 2009). Im Herzen konnte die Top2a ebenfalls nicht gefunden werden (Juenke and Holden, 1993). Aufgrund ihres hohen Vorkommens in selbstreplizierenden Zellen, wird ihr eine große Bedeutung in der DNA-Replikation sowie in der Trennung replizierter Chromosomen zugesprochen (Nitiss, 2009).

Die Top2b ist dagegen auch in Gewebe mit bereits ausdifferenzierten Zellen zu finden; sie wurde sowohl in den Nebennieren, im Eierstock, in der Milz, in Lymphknoten, im Uterus als auch im Herzen gefunden, wobei die kardiale Expression eher gering ist (Austin and Marsh, 1998; Capranico *et al.*, 1992; Juenke and Holden, 1993).

### **1.1.3 Katalytische Funktion der Top2b-Enzyme in biologischen Prozessen**

Die doppelsträngige DNA muss sowohl temporär für die Transkription und Rekombination als auch permanent für die Replikation voneinander getrennt werden (Champoux, 2001). Durch die Entwindung und Entspiralisierung der DNA kommt es allerdings an einer anderen Stelle in der DNA zu einer verstärkten Verdrillung, der sogenannten positiven Superspiralisierung. Diese Superspiralisierungen können durch die doppelstrangbrechende Funktion der Topoisomerase 2 aufgehoben werden (Champoux, 2001; Nitiss, 2009). Die Topoisomerasen nehmen daher als sogenannte „Strangbrecher“ eine wichtige Rolle ein, wobei jedes Monomer einen Strangbruch induziert (Ju *et al.*, 2006; Nitiss, 2009).

Dazu wird ein Doppelstrang (G-Segment) von dem Enzym durchgeschnitten und ein weiterer Strang (T-Segment) kann durch die entstandene Lücke passieren (vgl. Abbildung 1.1).

Im ersten Schritt nimmt die Topoisomerase das G-Segment über die N-terminale Domäne auf und bindet daran (Schritt 1). Durch die Bindung von ATP (Schritt 2) verändert das Enzym seine Konformation und dimerisiert die beiden N-terminalen Domänen. Durch die geschlossene Konformation wird das T-Segment gefasst (Schritt 3). Gleichzeitig bilden die aktiven Tyrosin-Zentren der beiden Untereinheiten Mg<sup>2+</sup>-abhängig mit den 5'-Phosphatgruppen des G-Segments kovalente Phosphotyrosinverknüpfungen, wodurch das

Enzym einen Doppelstrangbruch im G-Segment induziert (Schritt 4). Diese Verbindung wird als „Cleavage complex“ bezeichnet. Aufgrund des Strangbruches im G-Segment kann das T-Segment nun durch das G-Segment passieren. Es kommt zur Religation des Doppelstrangbruches und zu einem Austritt des T-Segments über die C-terminale Domäne (Schritt 5). Eine weitere Hydrolyse von ATP führt zu einer erneuten Veränderung der Konformation des Enzyms zurück in eine offene Position, sodass das G-Segment wieder freigegeben und eine erneute Strangpassage begonnen werden kann (Schritt 6) (Austin and Marsh, 1998; Berger *et al.*, 1996).

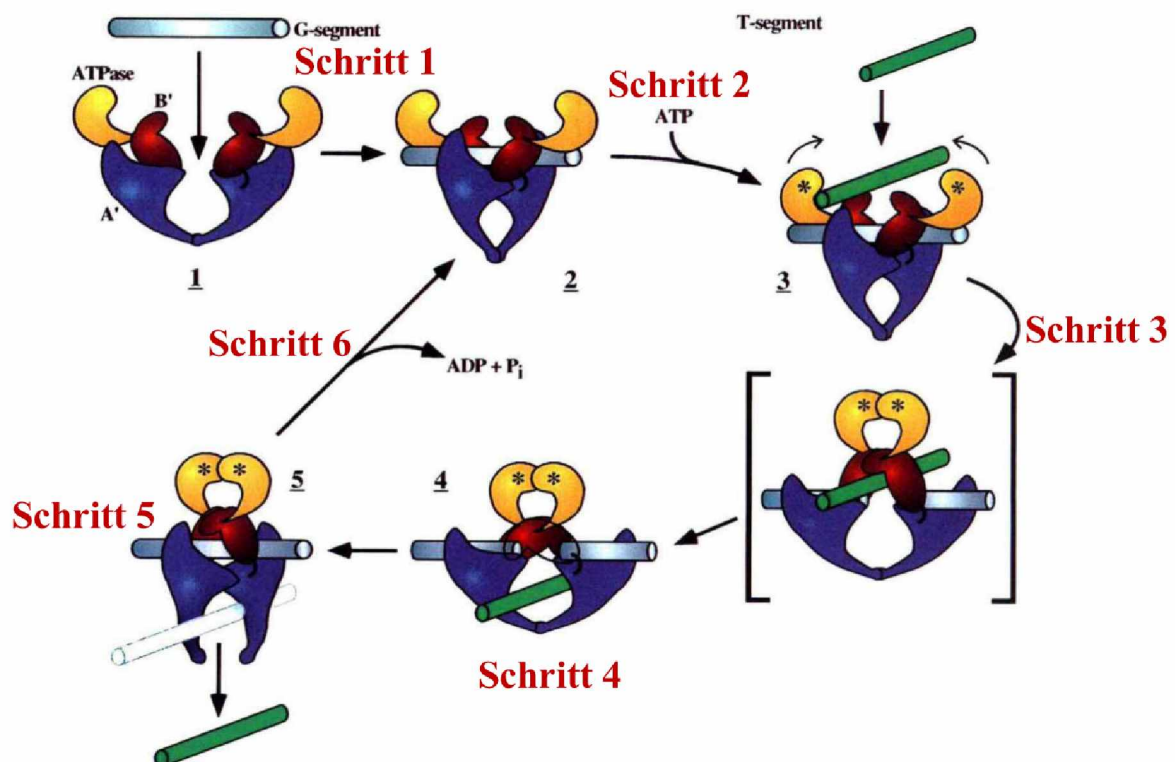


Abbildung 1.1 Modell für die katalytische Reaktion der Topoisomerase, modifiziert (Berger *et al.*, 1996)

Die ATP-Bindungsstelle tragende N-terminale Domäne ist gelb dargestellt, die zentrale Domäne dunkelrot und die C-terminale Domäne blau.

### 1.1.3.1 Beteiligung der Top2b an der Transkription

Die Top2b reguliert die Transkription von manchen eukaryotischen Genen; ihre Aktivität ist für die transkriptionelle Initiation in der Promotorregion unerlässlich (Ju and Rosenfeld, 2006). Top2b löst nach nukleärer Rezeptorstimulation mit 17 $\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>) am pS2-Promotor zusammen im Komplex mit PARP-1, DNA-PK, Ku70 und Ku86 einen DNA-Doppelstrangbruch aus (Ju *et al.*, 2006). Dieser DNA-Doppelstrangbruch ist lokalisiert an AT-reichen Linkern zwischen den Nukleosomen NucE und NucU. Nach Initiierung des Doppelstrangbruchs wird aufgrund einer Konformationsänderung das die Transkription reprimierende Histon H1 durch den Transkriptionsaktivator HMGB1/2 ersetzt und die Gentranskription wird aktiviert (Ju *et al.*, 2006).

Somit wurden die Top2b-induzierten DNA-Doppelstrangbrüche in Verbindung mit Komponenten aus der DNA-Schäden- und Reparatur-Maschinerie gebracht und es wurde gezeigt, dass dieser Zusammenschluss eine wichtige Rolle in der transkriptionellen Regulation besitzt (Ju *et al.*, 2006; Ju and Rosenfeld, 2006). Es ist unwahrscheinlich, dass Top2b an der Transkription aller Gene beteiligt ist, sondern vielmehr an der Transkription Top2b-sensitiver Gene (1.1.6.2) (Lyu *et al.*, 2006). Abbildung 1.2 gibt einen detaillierten Überblick über den molekularen Mechanismus der Top2b abhängigen Genregulation (Ju *et al.*, 2006).

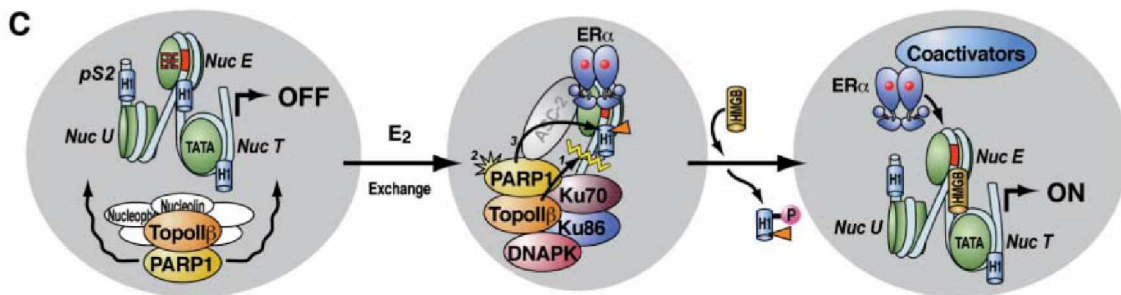


Abbildung 1.2 Molekularer Mechanismus der Top2b/PARP-1 abhängigen regulierten Gentranskription (Ju *et al.*, 2006)

#### 1.1.4 Topoisomerase als wichtiges Zielmolekül für Arzneimittel

Aufgrund ihrer biologischen Funktion in Topologie und Transkription steigt die Bedeutung der TOP2 in medizinisch-therapeutischen Fachgebieten. So konnte in den vergangenen Jahrzehnten eine Vielzahl an zytostatischen Arzneimitteln entwickelt werden, die TOP2 insbesondere TOP2A als ihr Target besitzen (Austin and Marsh, 1998; Champoux, 2001).

Im Groben wird zwischen den TOP2-Giften und den katalytischen TOP2-Inhibitoren unterschieden (Vavrova and Simunek, 2012).

Die **TOP2-Gifte** hemmen die Abspaltung der Topoisomerase aus dem „Cleavage Complex“ und es kommt zu zytotoxischen DNA-Läsionen (Champoux, 2001). Wichtige Vertreter dieser Stoffgruppe stellen das Epipodophyllotoxin Etoposid und die Anthrazyklinantibiotika Doxorubicin (DOX), Daunorubicin und Epirubicin dar, die zu den wichtigsten und essentiellsten Chemotherapeutika zur Behandlung vieler bösartiger Tumore und Leukämien zählen (Van Dalen *et al.*, 2011; Vejpongsa and Yeh, 2014; Weiss, 1992). Rund 60% der krebserkrankten Kinder werden mit Anthrazyklinen behandelt (van Dalen *et al.*, 2006).

Die **TOP2-Inhibitoren** hingegen hemmen die Aktivität des Enzyms ohne Stabilisierung des Cleavage Komplexes, wodurch kein Doppelstrangbruch induziert wird (Austin and Marsh, 1998). Wichtige Vertreter dieser Stoffgruppe beinhalten Merbarone, Aclarubicin und das Bisdioxopiperazin Dexrazoxan (DRZ).

### 1.1.5 Pharmakologisch induzierte Top2b-Hemmung führt zur Herzinsuffizienz

Neben verschiedenen bekannten toxischen Nebenwirkungen wird der Einsatz der Anthrazykline unter anderem durch die dosisabhängige Kardiotoxizität eingeschränkt, die noch während der Chemotherapie oder nach mehreren Jahren auftreten kann (Lyu *et al.*, 2007; Vejpongsa and Yeh, 2014).

Vor allem für Kinder stellt dies aufgrund ihrer langen Restlebenserwartung ein großes Problem dar (Van Dalen *et al.*, 2011). In Kindern wird das Risiko, an einer Anthrazyklin-induzierten Herzinsuffizienz zu erkranken, auf 10% geschätzt, gemessen 20 Jahre nach Start der Therapie und nach Gabe einer kumulativen Dosis von 300 mg/m<sup>2</sup> oder mehr (van Dalen *et al.*, 2006). Patienten mit einer geringeren kumulativen Dosis hatten ein vermindertes Risiko von 0,5% (van Dalen *et al.*, 2006). Eine Herzinsuffizienz trat in bis zu 16% der erfassten pädiatrischen Patienten ein (Kremer *et al.*, 2002).

Bislang wurde diese induzierte Herzschiidigung immer wieder durch Myokard-schiidigende oxidative Anthrazyklin-Metabolite erklart (Van Dalen *et al.*, 2011). Da die Herztoxizitat jedoch nicht durch Antioxidantien verhindert werden kann und die Bildung von freien Radikalen (oxidativer Stress) im Herzgewebe nur nach erhoheten supraklinischen Doxorubicin-Dosen messbar ist, wird dieser Mechanismus zunehmend in Frage gestellt (Gewirtz, 1999; Lyu *et al.*, 2007).

Eine neuere Hypothese impliziert die DOX-induzierte Herzschiidigung mit einer Hemmung der myokardialen Top2b (Zhang *et al.*, 2012). Erste Indizien wurden bereits 2007 gezeigt (Lyu *et al.*, 2007). DOX-induzierte DNA-Schiaden waren in Top2b-deletierten primaren embryonalen Mausfibroblasten deutlich reduzierter als in Wildtyp-Fibroblasten, weshalb die Top2b als Hauptzielmolekul fur die DOX-induzierten DNA-Schiaden identifiziert wurde (Lyu *et al.*, 2007).

Top2b-defiziente Tiere und Wildtyp-tiere wurden sowohl mit einer akuten als auch mit einer chronischen Doxorubicin-Dosis behandelt und immunhistochemisch untersucht (Zhang *et al.*, 2012). In Top2b-defizienten Tieren waren im Vergleich zu den Wildtypmausen eine 60%-ige Abnahme der DNA-Doppelstrangbruche und eine 70%-ige Abnahme apoptotischer Zellen detektierbar. Fünf Wochen nach der chronischen Doxorubicin-Gabe zeigten funktionelle Untersuchungen eine reduzierte Ejektionsfraktion in den Wildtyp-tieren; in den Top2b-defizienten Tieren blieb sie unverandert. Daraus folgerten die Autoren, dass Top2b erstens das wichtigste Target in der Doxorubicin-induzierten DNA-Schiadigung darstellt und zweitens als wichtiger Schlsselmediator in der Anthrazyklin-induzierten Herzinsuffizienz fungiert (Zhang *et al.*, 2012).

## **1.1.6 Genetisch induzierte Top2b-Deletion führt zu einem letalen Phänotyp und geht mit Genexpressionsänderungen einher**

### **1.1.6.1 Phänotypische Ausprägung einer konstitutiven homozygoten Top2b-Deletion**

Bis zum Zeitpunkt E15,5 unterscheiden sich die Top2b<sup>+/+</sup>-Wildtypiere hinsichtlich ihrer Größe nicht von den Top2b<sup>-/-</sup>-Tieren (Yang *et al.*, 2000). Erst im Anschluss sind die deletierten Tiere charakterisiert durch ein verlangsamtes Wachstum und ein um 65% verringertes Gewicht im Vergleich zu den Wildtypieren zum Zeitpunkt E18,5; gleichzeitig kann zum Zeitpunkt E17,5 eine gekrümmte Haltung der deletierten Tiere festgestellt werden, die auf eine unnormale Krümmung der Wirbelsäule zurückzuführen ist (Yang *et al.*, 2000). Zudem ist das Atmen erschwert, die Lungenalveolen kollabieren nach der Geburt und die Top2b-deletierten Tiere sterben an respiratorischem Versagen (Lyu and Wang, 2003; Nitiss, 2009; Yang *et al.*, 2000). In den Hauptorganen jedoch konnten keine schwerwiegenden morphologischen Anomalitäten festgestellt werden (Yang *et al.*, 2000).

Bei Mäusen, in denen mittels einer Cre-Rekombinase Technologie drei Exone des Top2b-Lokus in allen Zellen und speziell in verschiedenen Gehirnregionen wie dem Großhirn deletiert wurden, konnte zum Zeitpunkt E16,5 und E18,5 eine Reduktion der Gehirngröße in Top2b-deletierten Tiere im Vergleich zu Wildtypieren festgestellt werden (Lyu and Wang, 2003). Außerdem konnte ein verschobenes Beschichtungsmuster der sich entwickelnden Großhirnrinde in den deletierten Tieren gezeigt werden (Lyu and Wang, 2003).

Top2b<sup>-/-</sup>-embryonale Stammzellen, entstanden aus Top2b<sup>+/+</sup>-Tieren, zeigten weder morphologische noch transkriptionelle Unterschiede im Vergleich zu Wildtyp-embryonalen Stammzellen (Tiwari *et al.*, 2012). Die Autoren schlossen daraus, dass die Top2b für das Stammzelltranskriptionsprogramm nicht notwendig sei (Tiwari *et al.*, 2012). Nach der Differenzierung zu postmitotischen Neuronen konnten zum späteren Zeitpunkt jedoch auch Anzeichen der Degeneration in den Top2b<sup>-/-</sup>-Neuronen festgestellt werden (Tiwari *et al.*, 2012)

Zusammenfassend ist herauszustellen, dass homozygote Top2b-Nullmutanten perinatal einen letalen Phänotyp vorwiesen. Multiple Defekte während der gesamten neuronalen Entwicklung wurden verzeichnet.

### **1.1.6.2 Genexpressionsänderungen nach einer konstitutiven homozygoten Top2b-Deletion**

Aufgrund des sehr charakteristisch entwickelten Phänotyps der homozygoten Top2b-deletierten Tieren wurden Genexpressionsprofile angefertigt und die Genexpressionsveränderung von Top2b-deletierten Tieren versus Top2b-Wildtypieren an

isolierten Gehirnen untersucht (Lyu *et al.*, 2006). Nur 1 - 4% der Genexpressionsveränderungen waren jedoch Top2b abhängig. Die Expression von Genen, welche frühe Differenzierungsmarker und Zellwachstumsfunktionen kodieren, war nicht verändert. Vielmehr reguliert die Top2b die Expression von Genen, die am letzten Stadium der Differenzierung beteiligt sind. So waren z. B. Gene herunterreguliert, deren Produkte in der neuronalen Migration, an der Zelladhäsion und an der synaptischen Übertragung beteiligt sind. Wahrscheinlich ist die verringerte Expression von einigen dieser Gene verantwortlich für die neuronalen Defekte in dem sich entwickelnden Cortex (Lyu and Wang, 2003). Insgesamt waren über 90% aller differentiell regulierten Gene in den Top2b-deletierten Genen herunterreguliert, wobei Transkriptionsfaktoren sowohl hoch- (Gata3, Neurod1) als auch herunterreguliert (Myt11, Ebf1, Mef2c) waren. Eine Chromatin-Immunpräzipitationsanalyse (ChIP) zeigte eine direkte Interaktion der Top2b mit Promotorregionen einiger herunterregulierter Top2b-sensitiver Gene, sodass von einer direkten Rolle der Top2b in die Transkription dieser Gene ausgegangen werden kann (Abbildung 1.3). In den Promotorregionen einiger anderer Top2b-sensitiver Gene konnte hingegen keine Bindung festgestellt werden. Die Autoren sprachen der Top2b eine indirekte Rolle oder eine transiente Involvierung in die Transkription dieser Gene zu (Lyu *et al.*, 2006).

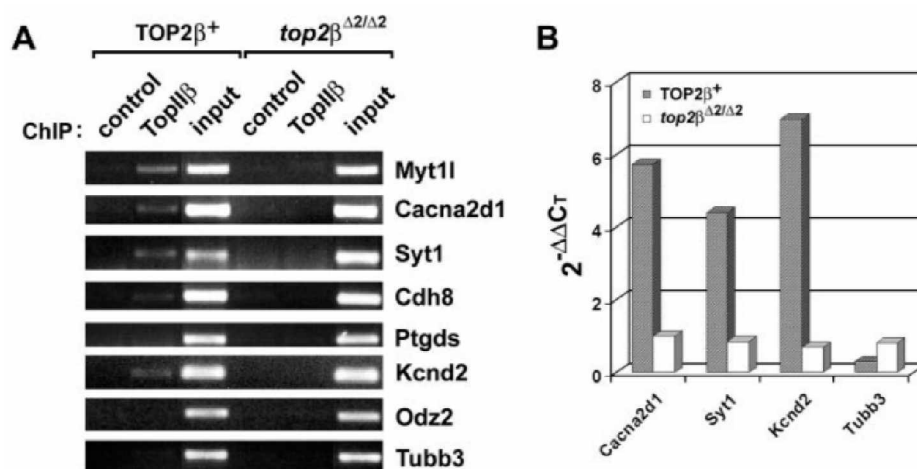


Abbildung 1.3 Chromatin-Immunpräzipitationsanalysen von Top2b an Top2b-sensitiven Genen an ausgewählten Promotorregionen (Lyu *et al.*, 2006)

ChIP-Analysen an isolierten Gehirnen von Top2b-Wildtypieren vs. Top2b-deletierten Embryonen an Tag E18,5. Die ChIP-Ergebnisse sind dargestellt A) mittels qualitativer PCR und B) mittels quantitativer qPCR. Cacna2d1, Syt1 und Kcnd2 sind Top2b-sensitiver Gene, Tubb3 dagegen nicht. Prozent vom Input auf der y-Achse gibt den Anteil an, wie viel Prozent von der gesamten genomischen DNA an den ausgewählten Bereich gebunden hat, bezogen auf die IgG Kontrolle.

### 1.1.6.3 Zusammenfassung

Eine **genetische Top2b-Deletion** geht mit Genexpressionsveränderungen einher und mündet in einen letalen Phänotyp; eine **pharmakologische Top2b-Hemmung** durch

Anthrazykline kann in eine Herzinsuffizienz führen (Abbildung 1.4) (Lyu *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2012).

Die Bedeutung der Top2b in der Entstehung der Herzinsuffizienz ist jedoch bislang unklar.

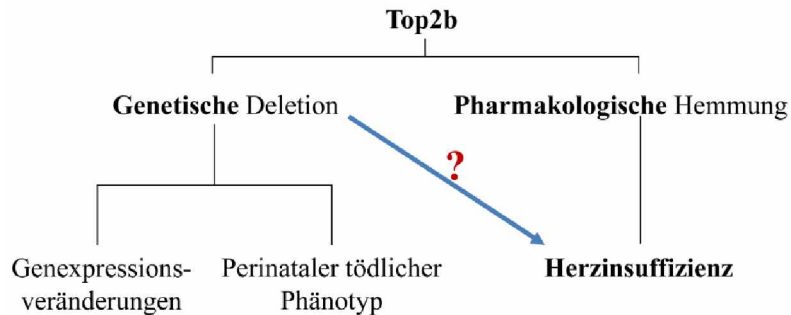


Abbildung 1.4 Zusammenfassung der Effekte einer genetischen und pharmakologischen Top2b-Hemmung

## 1.2 Die Herzinsuffizienz

### 1.2.1 Allgemeines und Definition

Die Herzinsuffizienz (HI) stellt eine der häufigsten kardiovaskulären Erkrankungen in den westlichen Industriestaaten dar (Hess, 2003). Pathophysiologisch handelt es sich um eine Funktionsstörung mit einer verminderten, nicht ausreichenden Pumpaktivität wodurch die Gewebsperfusion und -versorgung nicht mehr gewährleistet werden können (Brown *et al.*, 2005; Hoppe *et al.*, 2005; Lymperopoulos, 2013; McMurray *et al.*, 2012). Klinisch gesehen liegt dann eine Herzinsuffizienz vor, wenn typische Symptome (Dyspnoe, Lungenrasselgeräusche, Müdigkeit, Flüssigkeitsretention) in Folge einer kardialen Funktionsstörung auftreten (McMurray *et al.*, 2012).

Eine **kompensierte Herzinsuffizienz** geht trotz kardialen Funktionsstörungen ohne das Auftreten von Symptomen einher. Eine **dekompensierte Herzinsuffizienz** hingegen ist durch die typischen Symptome gekennzeichnet.

Eine **systolische Herzinsuffizienz** beinhaltet eine gestörte Kontraktion des Herzens mit verminderten EF-Werten ( $EF \leq 40\%$ ) (Mosterd and Hoes, 2007). In rund der Hälfte der Herzinsuffizienzpatienten bleibt die EF allerdings unverändert (Rigolli and Whalley, 2013); diese Form der Herzinsuffizienz in der die systolische Pumpfunktion normal oder zumindest nur leicht vermindert ist, wird als **diastolische Herzinsuffizienz** bezeichnet (Hess, 2003). Sie ist durch eine Zunahme des diastolischen Füllungsdruckes, ein Anstieg der Kammersteifigkeit und durch eine verminderte Kammerfüllung gekennzeichnet (Hess, 2003).



Es wird nach Beginn und Verlaufsform zwischen der **chronischen** und der **akuten** Herzinsuffizienz unterschieden. Während schwere Symptome bei der akuten HI innerhalb von 24 Stunden auftreten können, ist eine chronische HI durch eine länger anhaltende Symptomatik gekennzeichnet, die mitunter einer Hospitalisierung bedarf (Mosterd and Hoes, 2007).

## 1.2.2 Klassifizierung

Die Herzinsuffizienz wird entweder nach der New York Heart Association (NYHA) (Hoppe *et al.*, 2005) (Tabelle 1.1) oder alternativ nach den Kriterien der American Heart Association (AHA) in vier Stadien klassifiziert (Tabelle 1.2) (Hunt *et al.*, 2009).

*Tabelle 1.1 Klassifizierung der Herzinsuffizienz nach der New York Heart Association (NYHA) (Hoppe et al., 2005)*

| Stadium  | Beschreibung: Herzerkrankung...   |
|----------|---|
| NYHA-I   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• ohne körperliche Einschränkungen</li> </ul>  |
| NYHA-II  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• mit leichten körperlichen Einschränkungen</li> <li>• alltägliche Belastung führt zu: Erschöpfung, Luftnot, Angina Pectoris</li> <li>• keine Beschwerden in Ruhe</li> </ul> |
| NYHA-III | <ul style="list-style-type: none"> <li>• mit intensiven körperlichen Einschränkungen</li> <li>• geringe Belastung führt zu: Erschöpfung, Luftnot, Angina Pectoris</li> <li>• keine Beschwerden in Ruhe</li> </ul>   |
| NYHA-IV  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• mit Einschränkungen bei allen körperlichen Aktivitäten</li> <li>• Beschwerden auch in Ruhe, Bettruhe erforderlich</li> </ul>   |

*Tabelle 1.2 Klassifizierung der Herzinsuffizienz nach der American Heart Association (AHA) (Hunt et al., 2009)*

| Stadium | Beschreibung   |
|---------|--|
| A       | Hohes Herzinsuffizienzrisiko, keine vorliegende Symptomatik          |
| B       | Strukturelle Herzerkrankung, keine vorliegende Symptomatik           |
| C       | Strukturelle Herzerkrankung mit früheren oder vorliegenden Symptomen |
| D       | Fortgeschrittene strukturelle Herzerkrankung mit schweren Symptomen  |

## 1.2.3 Epidemiologie

In den westlichen Ländern leiden rund 1 - 2% der erwachsenen Bevölkerung an einer Herzinsuffizienz (Mosterd and Hoes, 2007). Das Erkrankungsbild Herzinsuffizienz tritt bei unter 50-Jährigen selten auf. Erst ab dem 50. Lebensalter steigen Prävalenz und Inzidenz fortschreitend mit dem Alter an; ca. 10% der männlichen und 8% der weiblichen Bevölkerung sind nach dem 60. Lebensjahr betroffen (Braunwald, 2013a; McMurray and Stewart, 2000; Mosterd and Hoes, 2007). Die Inzidenz liegt bei 5 - 10 Patienten bezogen

auf 1000 Patienten (Mosterd and Hoes, 2007). Außerdem ist die Prävalenz in den letzten Jahrzehnten gestiegen (McMurray and Stewart, 2000).

Trotz des therapeutischen Fortschritts wie der Blockade der Beta-Rezeptoren, der Hemmung des RAA-Systems oder auch des Einsatzes von Kardioverter-Defibrillatoren verstirbt jeder zweite Patient innerhalb von fünf Jahren; dies entspricht einer Mortalitätsrate vergleichbar der bei Krebserkrankungen (Braunwald, 2013a; Braunwald, 2013b).

### 1.2.4 Ätiologie

Die Ursachen der Herzinsuffizienz sind zahlreich (s. Tabelle 1.3). Die Herzinsuffizienz entsteht als Folge einer kardialen Schädigung (Lymperopoulos, 2013) und stellt den Endpunkt vieler kardiovaskulären Erkrankungen wie koronare Herzerkrankung, Hypertonus und dilatativer Kardiomyopathie dar (McMurray and Stewart, 2000). Entzündliche Kardiomyopathien und chemotherapeutisch-induzierte Kardiomyopathien (z. B. durch das Anthrazyklinantibiotikum Doxorubicin) können ebenfalls in eine Herzinsuffizienz münden (McMurray *et al.*, 2012).

In den westlichen entwickelten Ländern scheint die koronare Herzerkrankung mit ca. 60 - 70% die Hauptursache der Herzinsuffizienz darzustellen, die zusätzlich mit einem Hypertonus (ca. 20 - 30%) einhergehen kann (Braunwald, 2013a; Hess, 2003; McMurray and Stewart, 2000). Kardiomyopathien stellen in 5 - 10% der Fälle die Ursache für eine Herzinsuffizienz dar, valvuläre Erkrankungen dagegen ca. 3 - 10% (Hess, 2003). Oftmals jedoch ist es bei einem multimorbiden Patienten schwer, den eigentlichen Grund herauszufiltern (McMurray and Stewart, 2000).

*Tabelle 1.3 Ursachen der Herzinsuffizienz (McMurray et al., 2012)*

| <b>Ursachen der Herzinsuffizienz</b>            |
|---|
| • Koronare Herzerkrankungen                     |
| • Hypertonus                                    |
| • Dilatative Kardiomyopathie                    |
| • Entzündliche Kardiomyopathien                 |
| • Chemotherapeutika-induzierte Kardiomyopathien |
| • Und andere...                                 |

### 1.2.5 Pathophysiologie

Nach einer kardialen Schädigung kommt es zu funktionellen, strukturellen und molekularen Veränderungen im Herzen. Die auftretenden Umgestaltungen werden als **kardiale Remodellierung** bezeichnet (Cohn *et al.*, 2000). Physiologisch wird zunächst

versucht, durch die Aktivierung von verschiedenen kompensatorischen Gegenreaktionen, (neuroendokrine Aktivierungsmechanismen) die kardiale Funktion beizubehalten, doch irgendwann stellt sich ein maladaptiver Prozess ein, es entsteht ein „Circulus vitiosus“ (siehe Abbildung 1.5) (Brown *et al.*, 2005; Weil and Schunkert, 2006). In einem gesunden Herzen kann das Schlagvolumen durch eine stärkere diastolische Füllung (Vorlast) gesteigert werden. Bei der chronischen Herzinsuffizienz ist der Frank-Starling-Mechanismus jedoch abgeschwächt; eine Steigerung der Druckentwicklung ist bei einer systolischen Herzinsuffizienz nur mit einer überproportionalen Zunahme der Vorlast zu erreichen, was eine Dilatation des Ventrikels bewirkt (Weil and Schunkert, 2006). Neurohumorale Kompensationsmechanismen beinhalten eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems (Katecholamine) und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (Angiotensin II, Aldosteron) (Weil and Schunkert, 2006). Die vermehrte Freisetzung der Katecholamine wirkt positiv-inotrop, erhöht die Herzfrequenz und den peripheren Widerstand; Angiotensin II vermittelt über den AT1-Rezeptor eine Salz- und Wasserretention (das intravasale Volumen steigt) und reguliert die Freisetzung von Aldosteron (Weil and Schunkert, 2006). Die Ausschüttung natriuretischer Peptide hat aufgrund ihrer natriuretischen, vasodilatierenden und RAA-System hemmenden Wirkung, einen günstigen physiologischen und pharmakologischen Effekt in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz und kann somit der Aktivierung des sympathischen Nervensystems und der Entwicklung einer Myokardfibrose entgegenwirken (zusammengefasst in (Angermann and Ertl, 2004; Ruskoaho, 2003)). Sie sind bei vorliegender Herzinsuffizienz stark induziert und stellen wichtige natürliche Gegenspieler des Angiotensins II dar (Weil and Schunkert, 2006).

Die kurzfristige Aktivierung des Sympathikus stellt eine sinnvolle physiologische Maßnahme dar, um die kardiale Funktion zu erhalten. Eine chronische Stimulation jedoch führt über die Erhöhung der Vor- und Nachlast, der Salz- und Wasserretention, der Zunahme der kardialen Wandspannung mit Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs zu einer Progression der Herzinsuffizienz (Weil and Schunkert, 2006; Breckenridge, 2010).

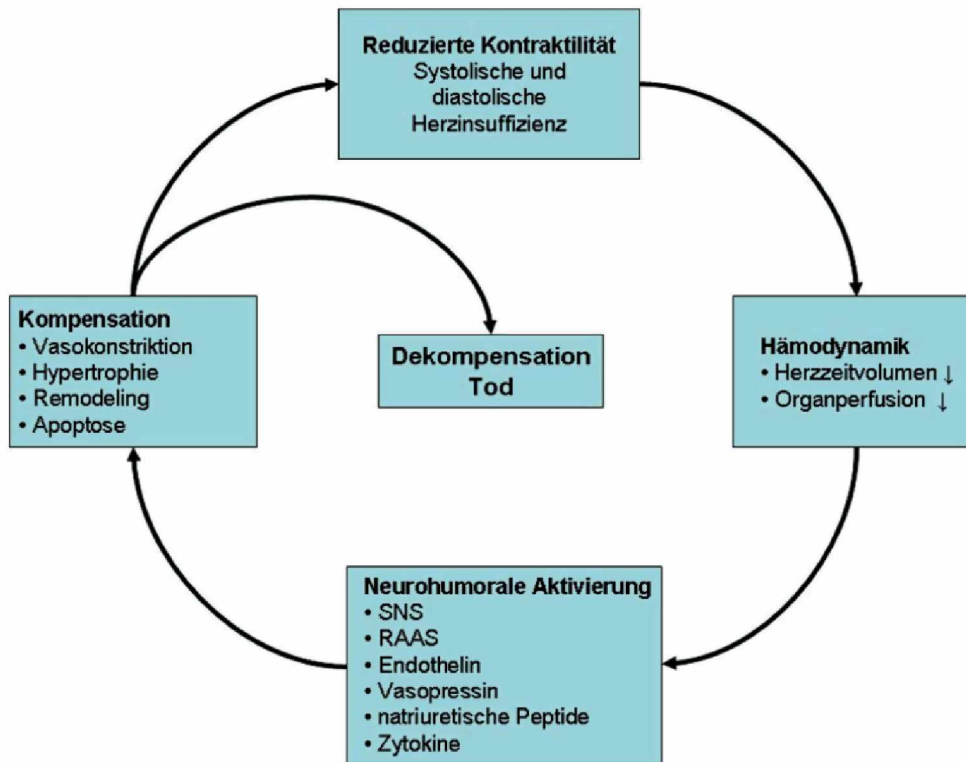


Abbildung 1.5 *Circulus vitiosus der chronischen Herzinsuffizienz*  
(Weil and Schunkert, 2006)

SNS= sympathisches Nervensystem; RAAS= Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Im Zuge der kardialen Remodellierung reagieren die Kardiomyozyten mit einer Umstrukturierung ihrer Organisation, die Anzahl der Myozyten wird weniger und die verbleibenden Myozyten liegen hypertrophiert vor. Dies geschieht in Zusammenhang mit einem initialen kompensatorischen Prozess, um das Schlagvolumen nach dem Verlust des kontraktiven Gewebes aufrechtzuerhalten (Brown *et al.*, 2005; Cohn *et al.*, 2000).

### 1.2.5.1 Aufbau des Interstitiums und fibrotische Veränderungen

#### Aufbau und Struktur des kardialen Interstitiums

Ein normales Herz besteht zu einem Drittel aus Kardiomyozyten und zu zwei Dritteln aus nichtmuskulären Zellen, wobei Fibroblasten die Mehrheit darstellen (Brown *et al.*, 2005; Weber, 1989). Neben Fibroblasten enthält das kardiale Interstitium auch Blutgefäße, kardiale Nerven, die Extrazelluläre Matrix (ECM) und Gefäßzellen (Endothelzellen, Perizyten, glatte Muskelzellen) (Kong *et al.*, 2013; Weber, 1989). Mastzellen und Makrophagen sind primär um die Gefäße herum vorhanden (Kong *et al.*, 2013).

Die ECM besitzt eine sehr komplexe Struktur und organisiert sich in ein Endomysium, ein Perimysium und ein Epimysium (Brown *et al.*, 2005; Weber, 1989). Das Endomysium besteht aus einem Fasergeflecht, das die einzelnen Kardiomyozyten umgibt, das Perimysium umfasst mehrere Kardiomyozyten-Bündel und das Epimysium schließlich umfasst die Gesamtheit (Weber, 1989).

ECM Proteine sind sowohl Kollagene als auch nichtkollagene Proteine (Eckhouse and Spinale, 2012). Die fibrillären Kollagene umfassen vor allem **Kollagen Typ I** mit ca. 80% und **Kollagen Typ III** mit ca. 10% (Brown *et al.*, 2005) aber auch Typ IV, V und VI Kollagene sowie Elastin, das sich in den Arterien ansammelt, Glykoproteine (Laminin, Fibronectin), Proteoglykane und Glykosaminoglykane (Berk *et al.*, 2007; Eckhouse and Spinale, 2012; Kong *et al.*, 2013; Manabe *et al.*, 2002; Weber, 1989).

Der Abbau der Kollagene erfolgt durch Enzyme, die den Matrixmetalloproteinasen (**MMP**) zugeordnet werden. Die Produktion dieser MMP-Enzyme wird wiederum von den Gewebehemmern der Metalloproteinasen (tissue Inhibitors of Metalloproteinases, **TIMP**) bestimmt, da sie die Aktivität der MMPs einschränken können (Brown *et al.*, 2005; Manabe *et al.*, 2002).

### **Fibrose und pathophysiologische Konsequenzen**

Die Fibrose zeichnet sich durch Veränderungen in Synthese und Abbau von Kollagen aus, wobei es zu einer disproportionalen Akkumulation von fibrillärem Kollagen kommt (Berk *et al.*, 2007).

Fibrose wird in zwei Gruppen klassifiziert: in die **reparative** und die **reaktive** Fibrose (Brown *et al.*, 2005). Bei einer **reparativen** Fibrose (Replacement) werden die Stellen, an denen Myozyten zu Grunde gegangen sind, durch strukturelle Narben ersetzt (Brown *et al.*, 2005). Bei der **reaktiven** Fibrose kommt es zu diffusen, vermehrten Ablagerungen von ECM an Stellen, die mit der fokalen Schädigung nichts zu tun haben (Brown *et al.*, 2005). Reaktive Fibrose erscheint als „interstitielle“ oder „perivaskuläre“ Fibrose und steht nicht in direktem Zusammenhang mit dem Untergang von Myozyten (Manabe *et al.*, 2002). Bei einer interstitiellen Fibrose liegen fibrilläre Kollagene im intermuskulären Raum vor (Manabe *et al.*, 2002). Bei der perivaskulären Fibrose kommt es zu einer Anreicherung von Kollagen in der Adventitia von intramyokardialen Koronararterien und Arteriolen (Manabe *et al.*, 2002).

Interstitielles Kollagen beeinflusst Größe und Form der Kammern sowie die ventrikuläre diastolische und systolische Funktion (Janicki and Brower, 2002). So führt das Vorliegen eines erhöhten Angebots an ECM-Proteinen zu einer Versteifung der Ventrikel und zu einer diastolischen Dysfunktion (Brown *et al.*, 2005; Kong *et al.*, 2013). Ein progressiver Anstieg der Fibrose hat ebenfalls eine systolische Dysfunktion zur Folge und eine linksventrikuläre Hypertrophie (Brown *et al.*, 2005). Gleichzeitig kann es aufgrund des vermehrten Angebots an Kollagen zu einer Unterbrechung der elektrotonischen Verschaltung zwischen den Kardiomyozyten kommen, was wiederum arrhythmogene Folgen nach sich ziehen kann (Brown *et al.*, 2005). Drittens schließlich kann die perivaskuläre Fibrose die Sauerstoffversorgung der Myozyten einschränken (Brown *et al.*, 2005).

## 1.2.6 Diagnostik

Das Erstellen der richtigen Diagnose beruht auf klinischen Untersuchungen und stellt eine große Herausforderung dar, da es sich bei der Herzinsuffizienz nicht um eine Krankheit, sondern um ein kompliziertes Syndrom handelt, welches durch verschiedene Symptome und medizinische Anzeichen charakterisiert ist und in eine reduzierte Lebensdauer des Patienten münden kann (Mosterd and Hoes, 2007; Roger, 2013). So leiden die Patienten unter typischen „Symptomen“ sowie unter klinischen „Zeichen“ der Herzinsuffizienz, welche sich in einer Verminderung der Auswurfraction und einem Umbau des linken Ventrikels widerspiegeln (Hess, 2003; McMurray *et al.*, 2012).

*Tabelle 1.4 Typische Symptome und klinische Zeichen einer Herzinsuffizienz (McMurray et al., 2012)*

| Symptome  | Zeichen                              |
|---|--------------------------------------|
| Atemnot   | Erhöhter Jugularvenendruck           |
| Anfallsartige nächtliche Dyspnoe oder Orthopnoe | Hepatojugulärer Reflux               |
| Verminderte Belastungstoleranz                  | 3. Herzton                           |
| Müdigkeit, Erschöpfung                          | Lateral verschobener Herzspitzenstoß |
| Knöchelschwellung                               | Herzgeräusche                        |

Neben der Diagnose einzelner Symptome und klinischen Zeichen müssen Elektrokardiogramme (EKG), Röntgen-Thorax-Untersuchungen und Echo-Untersuchungen durchgeführt werden, wobei die Echo die wichtigste nichtinvasive Methode zur Darstellung der kardialen Dysfunktion darstellt (Hess, 2003). Eine weitere Möglichkeit eines bildgebenden nichtinvasiven Verfahrens stellt die MRT dar, die aufgrund ihrer Exaktheit und Reproduzierbarkeit in der Charakterisierung von Volumen, Masse und Wandbewegung des Herzens als Goldstandard angesehen wird (McMurray *et al.*, 2012).

Die Bestimmung der Plasmakonzentrationen des natriuretischen Peptids Typ B (BNP) und der N-terminalen pro-Form (NTproBNP) kann ebenfalls zur Diagnostik hinzugezogen werden, da ansteigende Peptidkonzentrationen ein Kennzeichen für das Vorliegen einer Herzinsuffizienz darstellen (Hess, 2003; Mosterd and Hoes, 2007). Bei einem akuten Stadium der Herzinsuffizienz liegt der Konzentrations-Cutoff für NTproBNP bei 300 pg/ml und bei 100 pg/ml für BNP. In einem nicht-akuten Stadium liegen die Cutoff-Konzentrationen niedriger: 125 pg/ml für NTproBNP und 35 pg/ml für BNP (McMurray *et al.*, 2012).

## 1.2.7 Behandlung

An erster Stelle steht eine Prävention der Herzinsuffizienz durch frühzeitige Behandlung der kardiovaskulären Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus oder der koronaren Herzerkrankung (Hoppe *et al.*, 2005).

Die Behandlungsziele der Herzinsuffizienz-Therapie beinhalten die Linderung der Symptome und Zeichen, eine verminderte Hospitalisierung und eine Verbesserung des Überlebens (McMurray *et al.*, 2012). Im Rahmen einer nichtmedikamentösen Therapie sollen eine Gewichtsreduktion, eine Nikotinkarenz und ein Alkoholkonsum reduziert auf 10 ml reinem Alkohol bei Frauen und 20 ml reinem Alkohol bei Männern (pro Tag) erreicht werden (McMurray *et al.*, 2012). Begrenzte Salzzufuhr (<3 g am Tag) und Flüssigkeitsretention (1,5 – 2 l am Tag) in dekompensierten Patienten lindern zwar Symptome und Kongestion (McMurray *et al.*, 2012), sind aber umstritten (Aliti *et al.*, 2013). Moderates Training (nur in kompensierten Patienten) und eine multidisziplinäre Betreuung stellen wichtige Evidenz-basierte nicht pharmakologische Maßnahmen dar (McMurray *et al.*, 2012).

In der medikamentösen Behandlung einer chronischen systolischen Herzinsuffizienz sind Diuretika nur indiziert, wenn Symptome einer Flüssigkeitsretention (Ödeme, Gewichtszunahme) vorliegen. Alle Patienten sind kontinuierlich mit einem ACE-Hemmer zu behandeln (vorwiegende Vasodilatation (Breckenridge, 2010)), bei Unverträglichkeiten mit einem Angiotensin-Rezeptorblocker. Bei vorliegender Symptomatik werden Beta-Rezeptorenblocker (Metoprolol, Bisoprolol, Carvedilol oder Nebivolol) hinzugezogen, die negativ chronotrop wirken (Breckenridge, 2010). Eigentlich werden beide Medikamentengruppen, ACE-Hemmer und Beta-Rezeptorenblocker nach Diagnose einer chronisch systolischen Herzinsuffizienz zusammen verordnet, da ACE-Hemmer nur einen geringen Effekt auf die linksventrikuläre Remodellierung besitzen, während die Beta-Rezeptorenblocker eine bedeutende Verbesserung der EF erreichen können (McMurray *et al.*, 2012). Außerdem sind die Beta-Rezeptorenblocker antiischämisch sowie effektiver als ACE-Hemmer, um einen plötzlichen Herztod zu vermeiden (McMurray *et al.*, 2012).

Patienten, die trotz dieser Behandlung immer noch Symptome einer Herzinsuffizienz aufweisen, werden zusätzlich mit einem Mineralkortikoidrezeptor-Antagonist (Spironolacton, Eplerenon) behandelt; die Wirkung ist vasodilatatorisch und diuretisch (McMurray *et al.*, 2012; Breckenridge, 2010).

Ist diese Tripple-Therapie unzureichend, erhalten Patienten mit einem Sinus-Rhythmus von  $\geq 70$  Schläge/Minute und einer EF <35% Ivabradin (McMurray *et al.*, 2012).

Niedrig-dosierte Herzglykoside werden in Patienten mit einer EF von <45% verordnet, die trotz einer Behandlung mit ACE-Hemmern, Beta-Rezeptorenblocker und Mineralkortikoidrezeptor-Antagonisten noch symptomatisch sind. Neben den pharmakologischen Maßnahmen gibt es schließlich noch interventionelle Möglichkeiten (McMurray *et al.*, 2012).

### 1.3 Ziel dieser Arbeit: Die Rolle der Top2b im Herzen

Trotz des therapeutischen Fortschrittes in der Herzinsuffizienz-Behandlung verstirbt immer noch jeder zweite Patient innerhalb von fünf Jahren. Aus diesem Grund ist es unabdingbar, ein besseres Verständnis bezüglich der Pathophysiologie und Progression der Herzinsuffizienz zu entwickeln.

Topoisomerasen sind Enzyme, die durch die Generierung transienter DNA-Doppelstrangbrüchen superhelikalen Stress aufheben können. Neben der topologischen Funktion wird ihr eine wachsende Rolle in der Transkriptionsregulation zugeschrieben. Die Top2b wird hauptsächlich in postmitotischen Zellen exprimiert. Eine konditionelle Top2-Deletion bringt deutliche phänotypische Auswirkungen mit sich und ist stets mit Genexpressionsveränderungen assoziiert.

Die kardiale Rolle der Top2b wurde bislang nur einmal untersucht, wobei eine Top2b-Deletion keine Auswirkungen auf die Herzfunktion und Genexpression zeigte. Da diese Daten in direktem Widerspruch zu zahlreichen Publikationen zur transkriptionellen Rolle der Top2b stehen, ist es Ziel dieser Arbeit, die bislang unklare Rolle der Top2b in der normalen Herzfunktion sowie in der Entstehung und Progression der Herzinsuffizienz aufzuklären. Um den zugrundeliegenden Mechanismus einer Top2b-Deletion erfassen zu können, ist es erforderlich, sowohl die physiologische als auch die pathophysiologische Rolle dieses Enzyms in der Herzinsuffizienz-Entstehung zu erörtern.

Zu diesem Zweck sollte die Topoisomerase 2b speziell in Kardiomyozyten mittels eines TAM-induzierten Cre-Rekombinase-Modells zeit- und gewebsspezifisch deletiert werden. Zwei Wochen nach Tamoxifen-Behandlung sollte das Ausmaß der Deletion auf allen drei Ebenen (RNA, DNA und Protein) an isolierten Kardiomyozyten verifiziert und die funktionelle Herztätigkeit in Top2b-deletierten Tieren und Kontrolltieren mittels echokardiographischen und magnetresonanztomographischen Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht werden. Mit Hilfe von funktionellen Messungen sollten auftretende dysfunktionale Veränderungen zwischen Top2b-deletierten Tieren vs. Kontrolltieren erkannt werden. Histologische und elektronenmikroskopische



Untersuchungen sollten parallel dazu mögliche morphologische Umstrukturierungen und Einlagerungen fibrotischer und inflammatorischer Areale aufdecken.

In einer Hochdurchsatz-Sequenzierung sollten im Vergleich zu Kontrolltieren differentiell exprimierte Gene identifiziert und diese mittels Signalweg-Analysen in signifikante Signalwege eingruppiert werden. Da sich Kardiomyozyten nicht teilen, liegt die Vermutung nahe, dass die Top2b für die Transkription unabdingbar ist. Spezifisch dazu sollen kardiale Genexpressionsprofile von Top2b-deletierten Tieren vs. Kontrolltieren miteinander verglichen werden und die Bindung der Top2b an Promotoren ausgewählter differentiell-exprimierter Gene anhand von Chromatin-Immunpräzipitations-Analysen bestimmt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.1 Verwendete Puffer und Lösungen

| <b>A</b>  |  |
|---|--|
| <b>Aufschlusspuffer Lösung:<br/>BASE SOL.1*</b>             | 0,5 ml Stock BASE SOL. 50*<br>24,5 ml H <sub>2</sub> O   |
| <b>Aufschlusspuffer Stock:<br/>BASE SOL.50*</b>             | 1,25 N NaOH<br>10 mM EDTA, steril<br>H <sub>2</sub> O  |
| <b>B</b>  |  |
| <b>Beads (50%)</b>  | 1 ml 50% slurry Protein G-Agarose Beads (Millipore);<br>2* waschen mit 1 ml TE, vortexen und zentrifugieren<br>(2 min, 10.000 RPM);<br>1 Aliquot (100 µl) tRNA (Sigma) denaturieren bei<br>95°C, 5 min;<br>Beads resuspendieren in 1 ml TE+ 100 µl 10 mg/ml<br>BSA (PAA)+ 100 µl 10 mg/ml tRNA (Sigma R5636)<br>und für 2 h bei 4°C inkubieren auf dem<br>Überkopfschüttler. Im Anschluss 3* mit 1 ml TE<br>waschen und schließlich in 500 µl TE aufnehmen |
| <b>Blottingpuffer pH 10,4<br/>(Western Blot)</b>            | 3,03 g 25 mM Tris<br>14,4 g 192 mM Glycin<br>200 ml 10% Methanol<br>ad 1000 ml H <sub>2</sub> O  |
| <b>C</b>  |  |
| <b>Cacodylatpuffer (0,2 M)</b>                              | 10,7 g Cacodylsäure<br>250 ml H <sub>2</sub> O<br>pH 7,4 mit HCl<br>0,2 M Saccharose   |
| <b>Ca-FCS haltiger Puffer<br/>(Kardiomyozytenisolation)</b> | Salzpuffer mit Enzym (Kardiomyozytenisolation)<br>10% FCS<br>12,5 µM CaCl <sub>2</sub>   |
| <b>ChIP Cell Lysis Puffer</b>                               | 5 mM Hepes<br>85 mM KCl<br>0,5% Ipegal   |
| <b>ChIP Cell Lysis Puffer + PI</b>                          | 10 ml ChIP Cell Lysis Puffer<br>1 Tablette Proteinase Inhibitor (cOmplete Tablets,<br>Mini EASYpack, Roche)  |
| <b>D</b>  |  |
| <b>DEPC-H<sub>2</sub>O</b>                                  | 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC, Carl Roth<br>Karlsruhe) 1:1.000 in H <sub>2</sub> O lösen, über Nacht rühren, 20<br>min durch Autoklavieren inaktivieren  |
| <b>DOC Puffer</b>   | 10 mM Tris pH 8<br>250 mM LiCl   |

|   |   |
|---|---|
|   | 0,5% Ipegal<br>0,5% Deoxycholate;<br>1 mM EDTA  |
| <b>E</b>  |   |
| <b>Elutionspuffer (ChIP)</b>  | 200 mM NaCl<br>1% SDS   |
| <b>F</b>  |   |
| <b>Fixativ I (EM)</b>   | 1 ml 25% Glutaraldehyd (EM grade, Sigma)<br>5 ml 0,2 M Cacodylatpuffer (pH 7,4)<br>4 ml H <sub>2</sub> O                                    |
| <b>Fixativ II (EM)</b>  | 2 ml OsO <sub>4</sub> (4%) (Polysciences)<br>2 ml 0,2 M Cacodylatpuffer   |
| <b>I</b>  |   |
| <b>IP Dilution Buffer</b>   | 1,1% Triton X100<br>1,2 mM EDTA pH 8<br>16,7 mM Tris-HCl pH 8,1<br>167 mM NaCl  |
| <b>L</b>  |   |
| <b>Ladepuffer (6*)</b>  | 10 mM Tris/HCl pH 7,7<br>60% Glycerin<br>0,003% Bromphenolblau<br>60 mM EDTA  |
| <b>Laufpuffer (Western Blot) (1*)</b>   | 5* Laufpuffer 1:4 mit H <sub>2</sub> O verdünnen  |
| <b>Laufpuffer (Western Blot) (5*)</b>   | 15 g Tris<br>72 g Glycin<br>5 g SDS<br>ad 1000ml H <sub>2</sub> O   |
| <b>Lysepuffer (Western Blot)</b>  | 10ml RIPA<br>1 Tablette Proteinase Inhibitor (cOmplete Tablets, Mini EASYpack, Roche)<br>100µl Protease Firma                               |
| <b>Lysepuffer (ChIP)</b>  | 50mM Hepes/KOH pH 7,5<br>500mM NaCl<br>1mM EDTA<br>1% Triton X-100<br>0,1% Deoxycholate<br>0,1% SDS   |
| <b>Lysepuffer + PI (ChIP)</b>   | 10 ml Lysepuffer (ChIP)<br>1 Tablette Proteinase Inhibitor (cOmplete Tablets, Mini EASYpack, Roche)   |
| <b>M</b>  |   |
| <b>Mastermix cDNA Synthese (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit)</b> | 2 µl 10* RT Buffer<br>0,8 µl 25*dNTP Mix (100 mM)<br>2 µl 10* Random primers<br>1 µl Reverse Transcriptase<br>4,2 µl DEPC- H <sub>2</sub> O |
| <b>Milchpuffer (5%)</b>   | 5 g Milchpulver (AppliChem)<br>1*TBS-T  |

| N   |   |
|---|---|
| <b>Neutralisationspuffer<br/>Lösung: 1*</b>               | 0,5 ml Stock Neutralisationspuffer 50*<br>24,5 ml H <sub>2</sub> O  |
| <b>Neutralisationspuffer Stock:<br/>50*</b>               | 15,75 g Tris-HCl in 50 ml H <sub>2</sub> O  |
| <b>Nucleic Lysis Puffer</b>                               | 50 mM Tris-HCl pH 8,1<br>10 mM EDTA<br>1% SDS   |
| <b>Nucleic Lysis Puffer+PI</b>                            | 10 ml Nucleic Lysis Puffer<br>1 Tablette Proteinase Inhibitor (cOmplete Tablets,<br>Mini EASYpack, Roche)   |
| P   |   |
| <b>2* Probenpuffer</b>                                    | 1,51 g 125mM Tris/HCl pH 6,8<br>74,4 mg 2mM EDTA<br>4,0 g 4% SDS<br>20,0 g 20% Glycerin<br>20 mg 0,02% Bromphenolblau<br>ad 100 ml H <sub>2</sub> O und filtrieren<br>DTT zugeben (40mM Endkonzentration) Lagerung bei<br>-20°C   |
| <b>Propylenoxid:<br/>Aralditgemisch (1:1)</b>             | 26 g Araldite Renlam<br>24 g Araldite Hardener<br>2% Beschleuniger (2,4,6-<br>Tris(dimethylaminomethyl)phenol (Serva)   |
| <b>Puffer HK (1*)</b>                                     | 10* Buffer HK 1:10 mit H <sub>2</sub> O verdünnen   |
| <b>Puffer HK (10*)</b>                                    | 200 mM Tris HCl (pH 8,7),<br>100 mM NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub><br>40 mM MgCl <sub>2</sub> *6 H <sub>2</sub> O<br>100 mM KCl  |
| R   |   |
| <b>RIPA</b>   | 50 mM Tris/HCl pH 8<br>150 mM NaCl<br>1% Ipegal CA-630 (Sigma)<br>0,5% Natriumdeoxycholat (AppliChem) 0,1% SDS  |
| S   |   |
| <b>Salzpuffer mit Enzym<br/>(Kardiomyozytenisolation)</b> | Salzpuffer (Kardiomyozytenisolation)<br>0,14 mg/ml Liberase DH (Roche)<br>0,14 mg/ml Trypsin<br>12,5 µM CaCl <sub>2</sub>   |
| <b>Salzpuffer<br/>(Kardiomyozytenisolation)</b>           | 113 mM NaCl<br>4,7 mM KCl<br>0,6 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>0,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>1,2 mM MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O<br>12 mM NaHCO <sub>3</sub><br>10 mM KHCO <sub>3</sub><br>10 mM Hepes<br>30 mM Taurin<br>10 mM 2,3-Butanedionemonoxime<br>5,5 mM Glucose |

|   |   |
|---|---|
| <b>Sammelgel (4%)</b>   | 3,0 ml H <sub>2</sub> O<br>1,25 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8<br>0,65 ml 30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid<br>50 µl 10% SDS<br>7 µl TEMED<br>33µl 10% APS       |
| <b>STE-Puffer</b>   | 50 mM Tris pH 8, steril<br>100 mM NaCl, steril<br>1% SDS, sterilfiltriert<br>1 mM EDTA, steril<br>H <sub>2</sub> O, steril                                |
| <b>Sybr Green Mastermix<br/>1:40.000<br/>(selbst hergestellt)</b> | 1* Buffer HK<br>0,2 mM dNTPs<br>1:40.000 Sybr Green (Invitrogen™)<br>0,02 U/µl Taq HK<br>0,3 M Trehalose  |
| <b>T</b>  |   |
| <b>TAE-Puffer (1*)</b>  | 10* TAE-Puffer 1:10 mit H <sub>2</sub> O verdünnen  |
| <b>TAE-Puffer (10*)</b>   | 2 M Tris<br>1 M Eisessig<br>0,05 M EDTA Na <sub>2</sub> *2 H <sub>2</sub> O   |
| <b>Tamoxifenstock (20 mg/ml)</b>                                  | 0,8/ 0,65 g Tamoxifen<br>40/ 32,5 ml Maisöl (Sigma)   |
| <b>TBS (1*)</b>   | 10* TBS 1:10 mit H <sub>2</sub> O verdünnen   |
| <b>TBS (10*)</b>  | 12,11 g Tris<br>90 g NaCl<br>ad 1000 ml H <sub>2</sub> O pH 7.4   |
| <b>TBS-T (1*)</b>   | 1* TBS<br>0,05% Tween20   |
| <b>TE Puffer</b>  | 10 mM Tris pH 7,5<br>1 mM EDTA  |
| <b>Trenngel (6 und 12%)</b>                                       | 4,0/2,5 ml H <sub>2</sub> O<br>1,9 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,8<br>1,5/3,0 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid<br>75 µl 10% SDS<br>5 µl TEMED<br>50 µl 10% APS |
| <b>Waschpuffer (EM)</b>   | 0,2 M Cacodylatpuffer<br>1:1 mit H <sub>2</sub> O verdünnen   |

## 2.2 Primersequenzen

Tabelle 2.2 Primersequenzen

| Primername                | Forward primer (5'-3')         | Reverse primer (5'-3')        | Fragmentlänge (bp) |
|---------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------|
| <b>ANP</b>                | CACAGATCTGATGGATTTCAAGA        | CCTCATCTTCTACCGGCATC          | 68                 |
| <b>Arl15</b>              | GTAACCTTGATGGGTTTTTCACAG       | GCACCATTCTAAAGTGTGGCTTT       | 75                 |
| <b>BNP</b>                | GTCAGTCGTTTGGGCTGTAAC          | AGACCCAGGCAGAGTCAGAA          | 89                 |
| <b>Clint1</b>             | GACCTGGGAAGATTTAGAATTAAGC      | GCTGTTGTTTGGATAGCCTCA         | 147                |
| <b>Col1a1 (qPCR)</b>      | GAGCGGAGAGTACTGGATCG           | TACTCGAACGGGAATCCATC          | 204                |
| <b>Col1a1 (ChIP-qPCR)</b> | AGCCGCAAAGAGTCTACATGTCT        | GCCCCTAAGAGGAGCAGGAG          | 78                 |
| <b>Col3a1</b>             | ACCTCCTGGTGCTCTTGGT            | CTCTGTGTCCTTTCATACCAGG        | 163                |
| <b>Cre Rekombinase</b>    | CCAGGCTAAGTGCCTTCTCTACA        | AATGCTTCTGTCCGTTTGCCGGT       | 440                |
| <b>Egf</b>                | CTGTCCAATGAGCTGGTTACTCT        | AGAAAATGCAGTTGTTTCTCAGC       | 137                |
| <b>Fos</b>                | GCCCAGTGACGTAGGAAGTCCAT        | CAGTCGCGGTTGGAGTAGTAGGC       | 83                 |
| <b>Gm14005</b>            | GAGGAAAGTGCTGGGAAGTG           | CACCATGCAGTGCCATTC            | 150                |
| <b>Inpp5f</b>             | CCCCAAAATGGATGTAGATT           | CCAGGGGAACAAATGAAAATG         | 81                 |
| <b>Itgav</b>              | TCGCAGCTTTATAGTGAAACCTC        | CCACCATAACACAATGAGCATAA       | 88                 |
| <b>Jun</b>                | GAAAGAAGGGCCCAACTGTAGGA        | GCCATGGAGACCTCACCTAGAA        | 100                |
| <b>KChIP2 -500 bp</b>     | AGAGGTGCCTGAGAATTG             | GTGAAGGGGTGAACTGGA            | 138                |
| <b>KChIP2 -100 bp</b>     | CTTCTGCTCCGCTCTCACTT           | GATAGGGCGCTCACACAGT           | 171                |
| <b>KChIP2 +100 bp</b>     | AGGCCGAAAGGAGAGTTTGT           | GGTCTAGGGGGATGGAGTCT          | 118                |
| <b>LoxP</b>               | TAGTGCTGTTGTAGATAGGATCCTATTAAG | GCTCATAACTTCGTATAGCATAATTATAC | 490                |
| <b>Lrrc28</b>             | ACCCCTGCTGGTTCTAGGAAA          | TACCACAGAGCACCAATAGGG         | 75                 |
| <b>Mb21d2</b>             | CACAGACCCACATTTTGTGATAA        | CAAGAACTGTAGTGGGGTTTGTC       | 120                |
| <b>Mmp2 (ChIP-qPCR)</b>   | CTACAGATTCTGGTCCCAAAGA         | TTAGTGGCTTGGATCTAGTGGTC       | 111                |
| <b>Pfkfb4</b>             | GTGTGTTTCTTCTGCATGTGTGT        | CAGAATGGTTCTGGCTAATGTTC       | 135                |
| <b>PR3+PR7</b>            | ATATGGTACAGCAACAAAGCATTGACATA  | GAATTGTTTGCTGTGGATGCATGTA     | 450                |

| <b>Primername</b>        | <b>Forward primer (5'-3')</b>  | <b>Reverse primer (5'-3')</b> | <b>Fragmentlänge (bp)</b> |
|--------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| <b>PR5+PR6</b>           | TAGTGCTGTTGTAGATAGGATCCTATTAAG | GTCATAACTTCGTATAGCATACATTATAC | 490                       |
| <b>PR5+PR7</b>           | TAGTGCTGTTGTAGATAGGATCCTATTAAG | GAATTGTTTGCTGTGGATGCATGTA     | 682                       |
| <b>PR10+PR11</b>         | AGAAGCCAGAAGAGGGCATT           | ACCCACCAATGAGATGAAA           | 188                       |
| <b>18srRNA</b>           | GCTGCTGGCACCAGACTT             | CGGCTACCACATCCAAGG            | 171                       |
| <b>PR3+PR1</b>           | ATATGGTACAGCAACAAAGCATTTGACATA | ACACAAATGTGAACAAATTTGCTATGAC  | 618                       |
| <b>Tgfβ1</b>             | GGAGAGCCCTGGATACCAAC           | GGACCTTGCTGTACTGTGTGTC        | 189                       |
| <b>Tgfβ2 (qPCR)</b>      | ATCGTCCGCTTTGATGTCTC           | GCTGGGTGGGAGATGTTAAG          | 163                       |
| <b>Tgfβ2 (ChIP-qPCR)</b> | TGAGGAATTTGCAGTAGTCACTGT       | GTAGAAACGGGATGCTTAGCTG        | 82                        |

## 2.3 Tierversuch

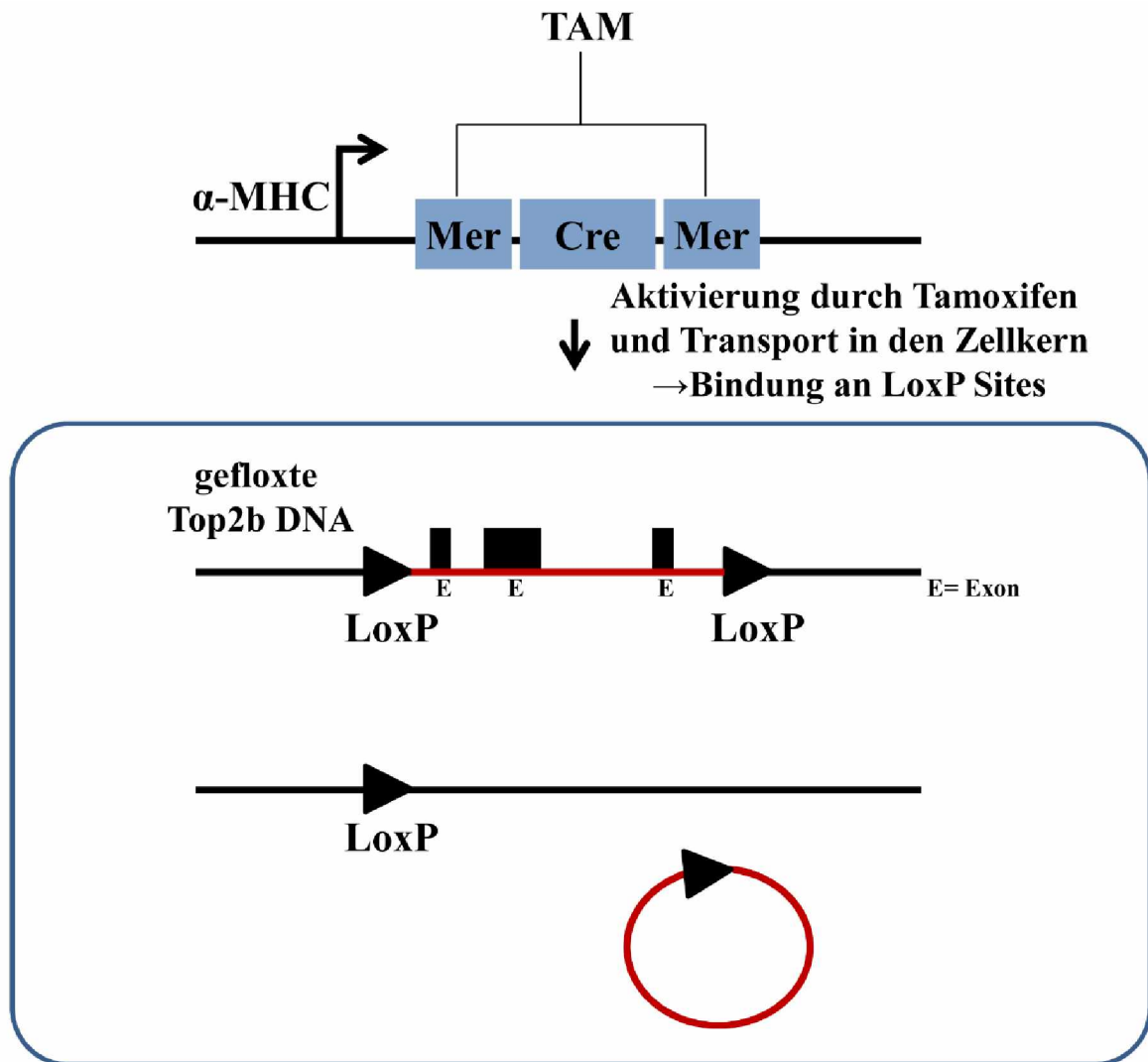
### 2.3.1 Mausstamm

Zur Generierung eines Mausstamms, in dem mittels konditionellen Knockouts die Topoisomerase 2b (Top2b) spezifisch in den Kardiomyozyten deletiert werden kann, wurden 2 Stämme kommerziell von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) bezogen.

Der homozygot gefloxt Top2b Mausstamm **Top2b flox/flox**(129S-Top2b<sup>tm2Jew</sup>/J Nr.008396) besitzt auf jedem Allel zwei LoxP-Seiten, die drei benachbarte Exons der Topoisomerase 2b einschließlich des aktiven Enzymzentrums („active-site tyrosyl residue“) umschließen. Kardiomyozyten-spezifische Deletion der Top2b wird erreicht durch Verpaarung dieser Mäuse mit einem heterozygotem Cre-Rekombinase-tragenden Mausstamm  **$\alpha$ -MHC-MerCreMer** (Tg(Myh6-cre/Esr1\*)1Jmk/J Nr.005650). Diese Cre-Rekombinase steht unter der Kontrolle des murinen „alpha myosin heavy chain“- ( $\alpha$ -MHC) Promoters, wodurch gewährleistet wird, dass die Cre-Rekombinase nur in den Kardiomyozyten exprimiert wird (Davis *et al.*, 2012; Lexow *et al.*, 2013; Sohal *et al.*, 2001). Die Cre-Rekombinase besitzt an ihren beiden Enden eine mutierte Estrogenrezeptor (MER)-Ligandenbindungsdomäne, an der jeweils endogen vorkommende Estrogene (z. B. 17 $\beta$ -Estradiol) in physiologischen Konzentrationen nicht binden können (Hougen *et al.*, 2010; Koitabashi *et al.*, 2009). Hingegen können synthetisch hergestellte Estrogenrezeptorliganden wie Tamoxifen (TAM) (die aktive Form 4-Hydroxytamoxifen) an diese Bindungsstelle binden (Koitabashi *et al.*, 2009) und somit die Expression des fusionierten Cre-Proteins (MerCreMer) temporär induzieren. Die Cre-Rekombinase liegt, gebunden an das Hitzeschockprotein 90 (Hsp90), zunächst nur im Zytoplasma vor (Andersson *et al.*, 2010; Tannour-Louet *et al.*, 2002). Durch eine TAM-Gabe wird der Komplex mit dem Hsp90 aufgelöst, die Cre-Rekombinase wird aktiviert und in den Nukleus transportiert (Andersson *et al.*, 2010; Verrou *et al.*, 1999) (Abbildung 2.1).

Nach entsprechender Verpaarung und Rückkreuzung dieser Stämme können somit zu einem gewählten Zeitpunkt durch TAM-Gabe die beiden Top2b-Allele inaktiviert werden. Die durch TAM aktivierte, in den Zellkern transportierte Cre-Rekombinase bindet an die beiden LoxP-Seiten und drei Exone des Top2b-Allels werden herausgeschnitten (Abbildung 2.1).





**Abbildung 2.1 Die spezifische konditionelle TAM-induzierte Deletion der Top2b in Kardiomyozyten**

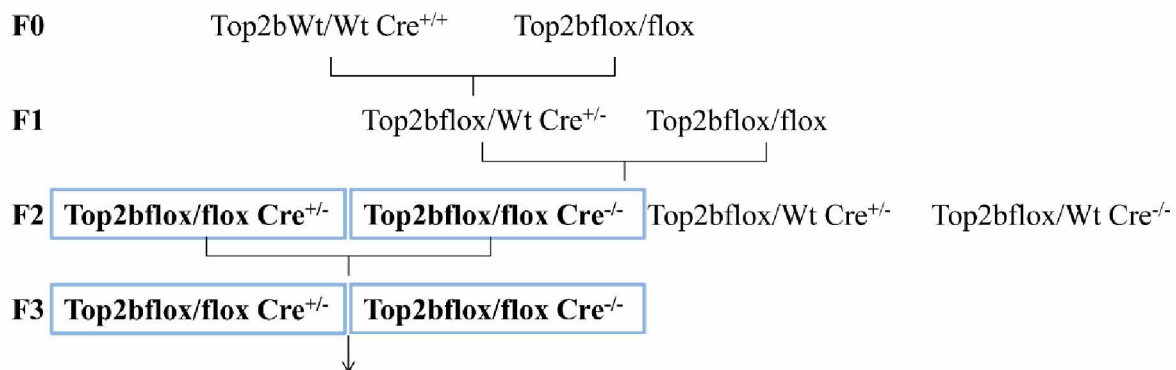
Nach Gabe von TAM bindet dieses an die beiden mutierten Estrogenrezeptoren der Cre-Rekombinase, wodurch die Cre-Rekombinase aktiviert und in den Zellkern transloziert wird. Dort bindet die Rekombinase an die beiden LoxP-Sequenzen, die drei Exone des Top2b-Lokus umschließen, und schneidet den geflochten Bereich aus.

### 2.3.2 Zuchtschemata

Die Zucht der Mäuse verlief entsprechend dem in Abbildung 2.2 gezeigten Zuchtschema. Die Zucht wurde durch meinen Vorgänger Dominik Fuhrmann unter der Leitung von Dr. med. Shiwei Deng, Prof. Leszek Wojnowski und Prof. Kurt Reifenberg begonnen und von mir im Juli 2011 in der dritten Maus/Zucht-Generation übernommen.

Zu Beginn wurden die homozygoten Top2bflox/flox Mäuse mit den  $\alpha$ -MHC-MerCreMer tragenden Mäusen verpaart. Es entstanden heterozygote  $\alpha$ -MHC-MerCreMer tragende Top2bflox/Wt Nachkommen (F1). Diese Mäuse wurden dann wiederum auf die Top2bflox/flox Mäuse zurückgekreuzt, um heterozygote  $\alpha$ -MHC-MerCreMer

Top2bflox/flox (Cre<sup>+</sup>)-Mäuse und Top2bflox/flox (Cre<sup>-</sup>)-Tiere zu generieren (F2). In Cre-exprimierenden Tieren können die beiden Top2b-Genkopien in Kardiomyozyten zu einem gewählten Zeitpunkt durch TAM-Gabe inaktiviert werden. Cre-negative Tiere dienten der Detektion von möglichen Cre-unabhängigen TAM-Effekten. Weder Cre<sup>+</sup>- noch Cre<sup>-</sup>-Mäuse zeigten ohne TAM-Behandlung Anzeichen einer gesundheitlichen Beeinträchtigung über einen Zeitraum von mehreren Monaten.



**Abbildung 2.2 Zuchtschemata zur Generierung der geflochtenen Cre<sup>+</sup>- und Cre<sup>-</sup>-Tiere**

Die von The Jackson Laboratory bezogenen homozygoten Top2bflox/flox Mäuse wurden mit den  $\alpha$ -MHC-MerCreMer tragenden Mäusen verpaart. Durch eine Rückkreuzung mit dem homozygoten Top2bflox/flox Stamm erhält man die gewünschten Genotypen, die in einer Erhaltungszucht weiter gezüchtet werden.

Die Erhaltungszucht verlief durch ständige Verpaarung von Cre<sup>+</sup>- und Cre<sup>-</sup>-Tieren. Dafür wurden drei bis vier Zuchtpaare mit je 2 Weibchen und einem Bock pro Käfig angesetzt. Die Zuchtpaare wurden ca. einmal pro Jahr bei sichtlichem Rückgang der Neugeborenenzahlen durch neue Tiere ersetzt. Die Tiere lebten in kontrollierter Umgebung (12 Stunden Hell/Dunkelzyklus) mit unbegrenztem Zugang zu Standardfutter und Wasser. Neugeborene Tiere wurden ca. 21 Tage nach der Geburt von den Elterntieren abgesetzt und genotypisiert. Die Unterscheidung der Mäuse erfolgte durch Ohrmarkierungen. Das Absetzen erfolgte durch die Tierpfleger. Der von The Jackson Laboratory kommerziell bezogene Mausstamm **Top2b flox/flox**(129S-Top2b<sup>tm2Jcw</sup>/J Nr.008396) wurde auf einem 129/Sv Hintergrund erstellt. Der zweite Mausstamm  **$\alpha$ -MHC-MerCreMer** (Tg(Myh6-cre/Esr1\*)1Jmk/J Nr.005650) wurde auf einem gemischten Hintergrund 129/Sv und Bl/6-Hintergrund entwickelt. Während der Zucht zur Etablierung der jeweils geflochtenen Versuchsgruppe (Cre<sup>+</sup>) und Kontrollgruppe (Cre<sup>-</sup>) wurde aus Zeit- und Kostengründen keine Rückkreuzung auf einen reinen Bl6 Hintergrund durchgeführt. Solch eine Rückkreuzung müsste sich, damit von einem „reinen“ kongenen Stamm ausgegangen werden kann, mindestens über 10 Generationen erstrecken und würde zwei bis drei Jahre dauern (Davidson; Markel *et al.*, 1997). Um mögliche Zuchtunterschiede zu minimieren, wurden für die Versuchsreihen nur Mäuse aus einer Generation verwendet.

### 2.3.2.1 Zuchtschemata der Rückkreuzung zu Cre<sup>+</sup> WT-Tieren

Zur Generierung von Cre-Rekombinase-tragenden ungeflochten Kontrolltieren wurden die  $\alpha$ -MHC-MerCreMer-tragenden Top2bflox/flox (Cre<sup>+</sup>)-Mäuse mit Wildtypen (129/Sv) verpaart. Die Nachkommen  $\alpha$ -MHC-MerCreMer-tragende heterozygot geflochte Top2bflox/+ Mäuse (Top2bflox/+ Cre<sup>+/-</sup>) wurden wiederum mit Wildtypen (129/Sv) verpaart. Die resultierenden  $\alpha$ -MHC-MerCreMer-tragenden ungeflochten Nachkommen (Top2b+/+ Cre<sup>+/-</sup>) wurden aus technischen Gründen nochmals mit 129/Sv zurückgekreuzt. Die entstandenen Tiere Cre<sup>+</sup> WT wurden als Cre-Rekombinase-tragende ungeflochte Kontrollgruppe in die Experimente mit eingeschlossen. Abbildung 2.3 verdeutlicht das Zuchtschema.

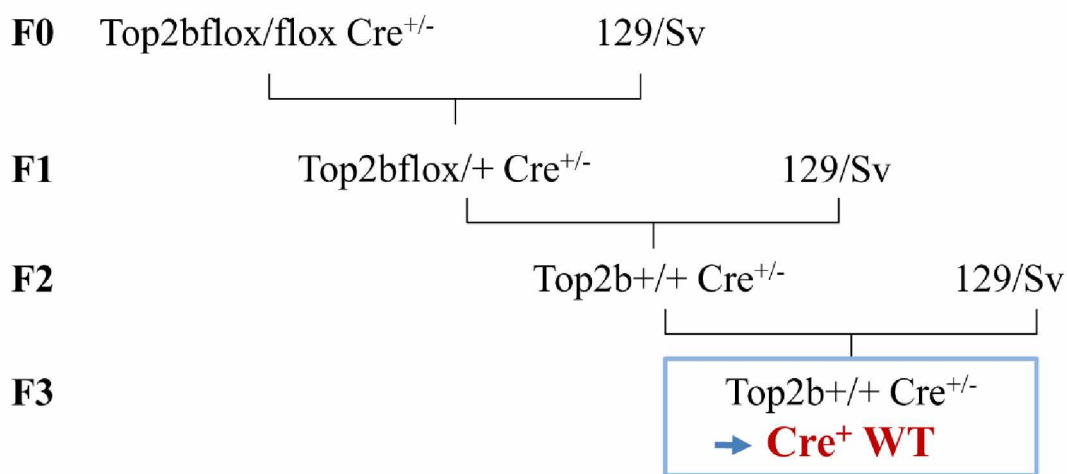


Abbildung 2.3 Zuchtschemata zur Generierung von Cre-Rekombinase-tragenden ungeflochten Kontrolltieren

### 2.3.3 Genotypisierung auf Cre-Rekombinase, LoxP und Wildtyp

Für die Genotypisierung wurde genomische DNA aus Schwanzspitzen und Ohrstanzen gewonnen. Das Protokoll zur DNA-Isolation aus Schwanzspitzen ist in unserem Labor seit mehreren Jahren etabliert. Das Protokoll zur Isolierung der DNA aus Ohrlochstanzen haben wir dankenswerterweise von Frau X, 1. Medizinische Klinik, Universitätsmedizin Mainz erhalten. Beim Absetzen der Tiere wurde mit einem sterilen Skalpell ein kurzes Stück vom Schwanz abgeschnitten bzw. eine Ohrstanz entnommen. Die Schwanzspitzen wurden zunächst in 500  $\mu$ l STE-Puffer (Tabelle 2.1) mit 25  $\mu$ l Proteinase K (20 mg/kg) (Roth) über Nacht bei 55°C im Wasserbad verdaut. Am nächsten Tag wurden die Haare durch Zentrifugation (10 min, 13.000 rounds per minute (RPM), Raumtemperatur (RT)) pelletiert. Der Überstand mit der angereicherten DNA wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Fällung erfolgte nun durch Zugabe von 1 ml eisgekühlten 100% Ethanol. Die Lösung wurde invertiert, bevor die DNA nun abzentrifugiert (20 min, 13.000 RPM, 4°C) und der Überstand verworfen wurde. Zum Waschen der DNA wurde 1 ml 70% Ethanol zum Pellet gegeben

und ein zweites Mal zentrifugiert (20 min, 13.000 RPM, 4°C). Der Überstand wurde entfernt, das Pellet an der Luft getrocknet und schließlich in 100 µl 10 mM Tris pH 8,0 aufgenommen.

Die DNA-Isolierung aus Ohrstanzen erfolgte durch Zugabe von 75 µl Aufschlusspuffer (BASE sol.1x Tabelle 2.1) und Inkubation für 30 min bei 95°C. Die Proben wurden im Anschluss auf 8/10°C heruntergekühlt. Zum Schluss gab man 75 µl Neutralisationspuffer 1\* (Tabelle 2.1) zur Neutralisation hinzu. Die Lösung wurde für 10 sec gevortext und anschließend in der PCR eingesetzt (Truett *et al.*, 2000).

Die DNA-Konzentration und Reinheit wurden photometrisch am peqLabNanoDrop® ND-1000 (Peqlab) gemessen. Im Anschluss wurde eine qualitative PCR (Mastercycler gradient, Eppendorf, VWR International GmbH) mit unten angefügtem Protokoll (Tabelle 2.3) durchgeführt. Für jeden Genotyp wurden eine positive, eine negative und eine Wasserkontrolle mitgeführt. Es wurden pro Maus drei Genotypisierungen durchgeführt; der Nachweis der homozygoten LoxP-Seiten und der Nachweis der heterozygot vorhandenen Cre-Rekombinase. Zur Vermeidung möglicher Zuchtfehler und zum Ausschluss eventueller Verwechslungen im Tierstall wurde ebenfalls auf WT genotypisiert. Die einzelnen PCR-Schritte wurden für die Cre-Rekombinase wie folgt durchgeführt: 1 min initiale Denaturierung bei 95°C, 30 Zyklen mit jeweils 1 min Denaturierung bei 95°C, 1 min Annealing bei 60°C und 1 min Elongation bei 72°C. Abgeschlossen wurde mit einer Endelongation bei 72°C über 7 min. Die PCR für die LoxP-Seiten und die WT-Sequenz wurde wie oben gefertigt mit der kleinen Veränderung einer 5-minütigen initialen Denaturierung und der Durchführung von 35 Zyklen. Die LoxP- und WT-Primer sowie die PCR-Bedingungen wurden der Veröffentlichung von Lyu entnommen (Lyu and Wang, 2003). Die Primer für die Cre-Rekombinase haben wir dankenswerterweise von Frau X, Institut für Humangenetik, Göttingen erhalten (Primersequenzen siehe Tabelle 2.2) (Konig *et al.*, 2014).

**Tabelle 2.3 Pipettierschema zur Durchführung der Genotypisierung der Cre-Rekombinase, der LoxP-Seiten und des Top2b WT-Allels**

| Reagenzien                              | Cre-Rekombinase (µl) | WT/LoxP-Allel (µl) |
|---|----------------------|--------------------|
| 10 mM dNTPs                             | 0,2                  | 0,2                |
| 10* Puffer E (Genaxxon)                 | 1                    | 1                  |
| Primer I                                | 0,6                  | 0,6                |
| Primer II                               | 0,6                  | 0,6                |
| Taq DNA-Polymerase<br>5 U/µl (Genaxxon) | 0,1                  | 0,1                |
| H <sub>2</sub> O                        | 6,4                  | 6,5                |
| DNA template                            | 1                    | 1                  |
| DMSO (AppliChem)                        | 0,1                  | -                  |

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Dazu wurde ein 1,8%-iges Agarosegel (LE Agarose, Biozym) in 1\* TAE-Puffer mit 3 µl/100 µl Roti-Safe Gelstain (Carl Roth GmbH + Co.KG) gegossen. Auf das Gel wurden 50-250 ng DNA in 6\* Ladepuffer (Tabelle 2.1) und ein entsprechender DNA-Marker (FastRuler™ Low Range DNA Ladder, Fermentas) aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V, ~20 – 30 min. Die Größe der DNA-Fragmente konnte unter UV-Licht durch Vergleich mit den Markerbanden beurteilt werden. Nach der Genotypisierung wurde die DNA bei -20°C gelagert.

### **2.3.4 Tamoxifen induzierte Deletion der Top2b in Kardiomyozyten**

5 bis 7 Monate alte, 25 – 35 g schwere weibliche Tiere wurden intraperitoneal mit TAM (Sigma) behandelt. Zunächst wurde die TAM-Lösung in Anlehnung an das aus Bad Nauheim erhaltene Protokoll hergestellt. Dafür wurde ein 20mg/ml konzentrierter Tamoxifenstock (Tabelle 2.1) hergestellt. TAM wurde in Maisöl auf dem Wasserbad bei 37°C suspendiert, bis keine Partikel mehr sichtbar waren. Während des Suspendierens wurde immer wieder gevortext und geschüttelt. Nach vollständigem Lösen des Tamoxifens wurden 2ml Aliquots hergestellt, die sofort bei -80°C weggefroren wurden. Nach dem Auftauen kann das Gemisch bis zu 4 Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

Wir haben TAM nach zwei verschiedenen Protokollen injiziert. In einigen Vorversuchen haben wir in Anlehnung an das Protokoll aus Bad Nauheim Tiere mit 100 mg/kg TAM an fünf aufeinanderfolgenden Tagen behandelt (kumulativ 500 mg/kg). Die Tiere wurden zunächst gewogen und die Injektionsmenge wurde anhand des Körpergewichts errechnet. Es wurden immer 5 µl des 20 mg/kg Stocks auf 1 g Maus mit einer 1 ml Spritze (Omnifix®-F, Braun) und 0,4\* 20 mm Kanülen gespritzt. In späteren Versuchen wurde in Anlehnung an Hall und Hougen et al. (Hall *et al.*, 2011; Hougen *et al.*, 2010) die TAM-Dosis auf eine dreimalige Injektion von 40 mg/kg/Tag reduziert. Zu diesem Zweck wurde die 20 mg/kg TAM-Stocklösung auf 8 mg/kg mit Maisöl verdünnt. Ziel war auch hier wieder, 5 µl pro 1 g Maus zu injizieren. Es wurden auch Versuche durchgeführt, in denen nur einmalig mit TAM 40 mg/kg gespritzt wurde. Aufgrund der nicht effizienten Top2b-Deletion wurde von diesem Spritzschema allerdings wieder Abstand genommen.

Die Mäuse wurden während der Behandlung jeden Tag beobachtet und gewogen.

7 - 12 Tage nach der letzten TAM-Injektion wurde das Ausmaß der Deletion bestimmt. Dafür wurden die Mäuse nach Bad Nauheim ins Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung transportiert und die Kardiomyozyten isoliert (2.3.5).

Alle tierexperimentellen Untersuchungen wurden durch die Tierschutzkommission des Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz genehmigt.

(Aktenzeichen des Tierversuchsantrags: 23 177-07/G 12-1-043)

### 2.3.5 Isolation von Kardiomyozyten

Die Kardiomyozytenisolation erfolgte am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim durch Frau X. Die Isolation erfolgte in Anlehnung an eine Langendorff Perfusion und das Protokoll wurde von Frau X über mehrere Jahre entwickelt und etabliert. Im Folgenden sollen aus diesem Grund die einzelnen Isolationsschritte nur kurz beschrieben werden. Die Maus wurde zunächst mit einer Ketamin-Rompur-0,9% NaCl-Lösung(1:1:2) narkotisiert und zur Thrombozytenaggregationshemmung mit 200 µl 25.000 I.E./ 5 ml Heparin injiziert. Im Anschluss wurde das Fell der Maus abgezogen, der Brustkorb geöffnet und das Herz mit den Lungenflügeln entnommen. Das Herz wurde zunächst in einem Salzpuffer (Tabelle 2.1) gewaschen und an den Lungenflügeln aufgehängt. Unter dem Mikroskop wurde die Aorta freipräpariert, mit einer Nadel kanneliert und am Truncus brachiocephalicus festgebunden. Um zu sehen, ob die Kanüle richtig liegt, und um das Herz durchzuspülen, wurde zunächst 1 ml Puffer mit einer Spritze durch die Kanüle gespritzt. Nun wurde das Herz luftblasenfrei an der Langendorff Perfusionsapparatur angehängt.

Die ganze Apparatur besteht aus einer Doppelwand, in der im Zwischenraum 37°C warmes Wasser zur Wärmung des Puffers fließt. Zunächst wurde ca. 20-30 ml reine Pufferlösung in die Apparatur gefüllt, die durch die kannelierte Aorta lief und aus der Herzwand tropfend in einem Becherglas aufgefangen wurde. Die Puffer- und Enzymlösung (Tabelle 2.1) wurden auf 37°C erwärmt. Als ca. 20 ml Puffer verbraucht waren, wurden weitere 20 ml Pufferlösung, diesmal angereichert an Enzym in die Apparatur gegeben. Die im Becherglas aufgefangene Enzymlösung wurde immer wieder in die Apparatur nachgefüllt. Als die Tropfgeschwindigkeit schneller wurde, sich das Herz aufblähte und weiß und weich wurde, konnten die aufgefangenen Tropfen am Mikroskop auf Kardiomyozyten kontrolliert werden. Waren Kardiomyozyten nach ca.1 h sichtbar, war der enzymatische Verdau beendet und das Herz konnte abgehängt werden. Die Ventrikel wurden vom Rest abgetrennt und im Enzympuffer klein gerupft. Mit einer Pipette wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Gefäß überführt und der enzymatische Verdau durch Zugabe eines Ca-FCS-haltigem Puffers (Tabelle 2.1) abgestoppt. Die Suspension wurde kurz stehengelassen und dann der lose Überstand in ein neues 50 ml Falcon-Gefäß überführt. Das restliche Pellet wurde nochmals in dem Ca-FCS-haltigem Puffer suspendiert, zentrifugiert (1 min, 300 RPM, RT) und der Überstand verworfen. Das lose Pellet wurde zu dem vorherigen Überstand überführt. Diese Suspension wurde durch einen 100 µm Meshfilter gefiltert, um

andere Zelltypen wie Fibroblasten und Endothelzellen zu entfernen. Die gefilterte Lösung wurde nochmals zentrifugiert (1 min, 300 RPM, RT), bevor nach Bestimmung der Zellzahl der Überstand verworfen wurde. Pro Maus konnten ca.  $1 - 1,5 \cdot 10^6$  Zellen isoliert werden. Das Pellet wurde nochmals mit PBS gewaschen, zentrifugiert (1 min, 800 RPM, RT) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde nun in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Reinheit der isolierten Kardiomyozyten betrug 99,5%.

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 DNA-Extraktion

Die DNA-Isolierung erfolgte nach dem in 2.3.3 beschriebenen Protokoll.

#### 2.4.1.1 Qualitativer Nachweis der Deletion

Zum qualitativen Nachweis des Knockouts wurden drei Primerpaare (PR3+PR7; PR5+PR6; PR5+PR7 Tabelle 2.2) verwendet (Lyu and Wang, 2003). Mittels PR3 und PR7 konnte festgestellt werden, ob der Knockout funktioniert hat, da sich nur bei erfolgreichem Knockout ein Produkt (450 bp) bilden konnte. PR5 und PR6 detektieren die LoxP-Seite (stromabwärts, 490 bp, vergleichbar zur LoxP-Genotypisierung), PR5 und PR7 bildeten ein Produkt (682 bp), wenn der Knockout nicht vollständig verlaufen war (siehe Abbildung 2.4).

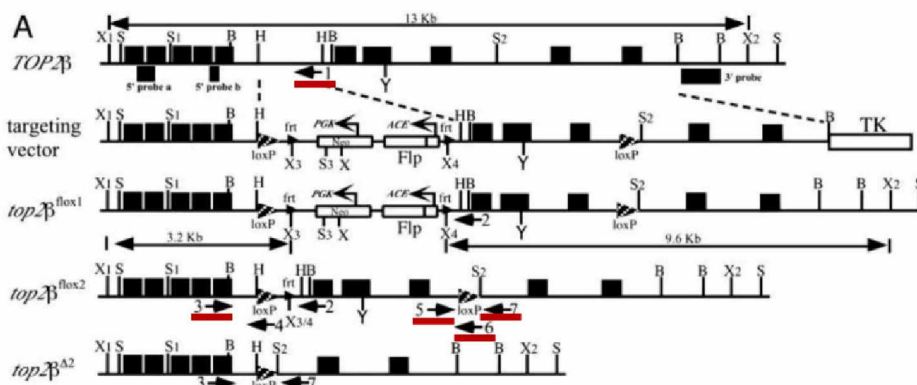


Abbildung 2.4 Darstellung der Primerlokalisierung nach Lyu et al. (Lyu and Wang, 2003)

Die Abbildung zeigt unter anderem die Anordnung der verwendeten Primer (rot unterstrichen) zur Detektion der Top2b-Deletion. Drei Exone der Top2b, die von zwei LoxP-Seiten umschlossen sind, werden durch Bindung der Cre-Rekombinase an die LoxP-Seiten ausgeschnitten. Die Primer 5 und 6 detektieren die LoxP-Seite downstream, die Primer 3 und 7 detektieren eine erfolgreiche Top2b-Deletion und die Primer 5 und 7 bilden ein Produkt bei unvollständigem Knockout. Die Primer 3 und 1 hingegen können zur Detektion des WT-Allels verwendet werden.

Die einzelnen PCR-Schritte wurden wie folgt durchgeführt: 5 min initiale Denaturierung bei 95°C, 25 Zyklen mit jeweils 1 min Denaturierung bei 95°C, 1 min Annealing bei 60°C und 1 min Elongation bei 72°C. Abgeschlossen wurde mit einer Endelongation bei 72°C

über 5 min. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese.

*Tabelle 2.4 Pipettierschema zur qualitativen Detektion der Top2 Deletion auf DNA-Ebene*

| Reagenzien (µl)        | qualitativer DNA-Knockout |
|------------------------|---------------------------|
| 10 mM dNTPs            | 0,2                       |
| 10* Puffer S, (Peglab) | 1                         |
| Primer I               | 0,6                       |
| Primer II              | 0,6                       |
| 10* Cresol             | 1                         |
| Taq 5 U/µl, (Peqlab)   | 0,1                       |
| H <sub>2</sub> O       | 5,5                       |
| DNA template           | 1                         |

#### 2.4.1.2 Quantitativer Nachweis der Deletion

Für den quantitativen Nachweis der Deletion wurden neue Primer (PR10+PR11 Tabelle 2.2) entworfen, da die Produkte der oben genannten Primer PR3, 5 und 7 für eine Real-time Quantifizierung zu groß waren. Mittels eines selbst hergestellten Sybr Green Mastermix 1:40.000 (Tabelle 2.1) wurde die DNA-Menge quantifiziert. Als interner Standard wurde 18srRNA mitgeführt. Pro Probe wurden 2 µl DNA eingesetzt, sodass die Menge an DNA/Probe ca. 50 ng betrug. Alle Proben wurden in Triplets nach Protokoll des Sybr Green Assays (Tabelle 2.5) pipettiert und auf einem StepOnePlus™Cycler (Applied Biosystems) ausgeführt. Die einzelnen PCR-Schritte wurden wie folgt durchgeführt: 2 min initiale Denaturierung bei 94°C und 40 Zyklen mit jeweils 15 sec Denaturierung bei 94°C und 1 min Annealing/Elongation bei 60°C. Die Quantifizierung erfolgte mit der  $2^{-\Delta Ct}$  Methode (2.4.5).

*Tabelle 2.5 Sybr Green Assay*

| Sybr Green Assay              | qualitativer DNA-Knockout (µl) |
|-------------------------------|--------------------------------|
| Sybr Green Mastermix 1:40.000 | 10,81                          |
| 10µM Primer I                 | 0,5                            |
| 10µM Primer II                | 0,5                            |
| H <sub>2</sub> O              | 11,19                          |
| DNA                           | 2                              |

#### 2.4.2 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem peqGOLD TriFast™ Kit (Peqlab) entsprechend dem Herstellerprotokoll mit kleinen Veränderungen. Ein Kardiomyozytenpellet wurde in 1ml peqGOLD TriFast™ aufgenommen. Das Pellet löste sich trotz Stehenlassen und leichtem



bis mittelstarkem Vortexen nur sehr schlecht auf. Mit dem TissueLyser (Qiagen) wurde das Pellet zerkleinert (2\* 4 min bei 50 Hz). Bei RNA-Isolierung aus Herzgewebe wurden ca. 40 - 50 mg schwere Stücke in 1 ml peqGOLD TriFast<sup>TM</sup> aufgenommen und ebenfalls mit dem TissueLyser zerkleinert (3\* 4 min bei 50 Hz). Die Proben wurden anschließend für 5 min bei RT inkubiert und 0,2 ml Chloroform hinzugegeben. Sie wurden 15 s kräftig geschüttelt und für 3 - 10 Minuten bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde zur Phasentrennung zentrifugiert (15 min, 13.000\*g, 4°C). Die obere farblose wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die enthaltende RNA mit Isopropanol präzipitiert. Die Probe wurde dafür mit 0,5 ml Isopropanol gemischt und bei -20°C für 1 h inkubiert. Zum Pelletieren der RNA wurde die Lösung zentrifugiert (20 min, 13.000\*g, 4°C), der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet zweimal mit 75% Ethanol durch Vortexen und anschließende Zentrifugation (20 min, 12.000\*g, 4°C) gewaschen. Das Pellet wurde für 5-10 min an der Luft getrocknet und in 20-30 µl Diethylpyrocarbonat behandeltem Wasser (DEPC-H<sub>2</sub>O, Tabelle 2.1) bei 55°C und 300 RPM für 10 min gelöst. Die RNA-Konzentration wurde am PeqlabNanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 (Peqlab) gemessen und die RNA bei -80°C gelagert.

### 2.4.3 Reverse Transkription für quantitative PCR

Nach der RNA-Isolierung erfolgte die Synthese der cDNA durch Reverse Transkription mittels des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems). Für die cDNA-Synthese wurde eine RNA-Konzentration von 1 µg/10 µl benötigt. Da die erhaltenen RNA-Konzentrationen aus der RNA-Isolierung etwas geringer ausfielen, konnten zum Teil nur 300-700 ng/µl RNA/Probe transkribiert werden. Dafür wurden entsprechende Verdünnungen auf 10 µl Gesamtvolumen in DEPC- H<sub>2</sub>O vorgenommen. 10 µl RNA-Lösung wurden dann mit 10 µl Mastermix (siehe Tabelle 2.1) vermischt und die reverse Transkription wurde durchgeführt. Das PCR- Programm lautete wie folgt: 10 min 25°C, 120 min 37°C, 5 min 85°C.

### 2.4.4 Quantitative PCR

In einer quantitativen real-time PCR wurde die cDNA nun quantifiziert. Als interner Standard wurde ein Test auf 18srRNA mitgeführt. Pro Probe wurde 1 - 3 µl cDNA verwendet (abhängig von der Höhe der eingesetzten RNA-Konzentration). Die cDNA sollte dabei eine Konzentration von ~50 ng haben. Alle Proben wurden in Triplets pipettiert, um eventuelle Pipettierfehler später auszugleichen. Für die Analyse des internen Standards wurde die cDNA 500- oder 2.000-fach mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Die Quantifizierung erfolgte zum einen mit einem speziellen TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assay, der von Applied Biosystems bezogen wurde. Es wurden die folgenden Sonden für Top2b

(Mm00493776\_m1) und 18srRNA(Mm03928990\_g1 Rn 18s;L) verwendet. Zum anderen wurde die Quantifizierung mittels eines SybrGreen Assays von Quantas (PerfeCTa® Sybr® Green FastMix®, Quantas) beides auf einem StepOnePlus™Cycler (Applied Biosystems) durchgeführt. Das PCR-Programm lautete wie folgt: 5 min initiale Denaturierung bei 95°C und 40 Zyklen mit jeweils 15 sec Denaturierung bei 95°C und 1 min Annealing/Elongation bei 60°C. Die Quantifizierung erfolgte ebenfalls mit der  $2^{-\Delta Ct}$  Methode (2.4.5).

Das Pipettierschema für den TaqMan Assay ist in Tabelle 2.6 dargestellt, das Pipettierschema für den Sybr Green Assay von Quantas in Tabelle 2.7.

*Tabelle 2.6 Pipettierschema des TaqMan-Assays zur quantitativen mRNA-Expressionsanalyse*

| TaqMan Assay   | TOP2B (µl) | 18srRNA (µl) |
|--|------------|--------------|
| 10* Buffer HK  | 2          | 2            |
| 10 mM dNTPs  | 0,4        | 0,4          |
| 20* Assays on Demand Gene Expression Assay Mix   | 1          | 0,5          |
| Taq HK 1U/µl [diese Taq wurde von Prof. Dr. rer. nat. Hartmut Kleinert, Institut für Pharmakologie Mainz, hergestellt] | 0,4        | 0,4          |
| H <sub>2</sub> O   | 15,2- 13,2 | 15,7- 13,7   |
| cDNA template  | 1-3        | 1-3          |

*Tabelle 2.7 Pipettierschema des Sybr Green Assays von Quantas*

| Sybr Green Assay (Quantas) | µl/20µl qPCR |
|----------------------------|--------------|
| SYBR Mix Quantas           | 10,0         |
| 10µM Primer I/II           | 0,4          |
| H <sub>2</sub> O           | 8,6          |
| DNA template               | 1,0          |

### 2.4.5 Quantifizierung der Ergebnisse

Die Quantifizierung erfolgte mit der  $2^{-\Delta Ct}$ -Methode normalisiert auf die Expression der 18srRNA (Livak and Schmittgen, 2001). Graphisch dargestellt wurden die normalisierten mRNA-Expressionen als  $2^{-\Delta Ct}$ -Werte.

Für die statistische Berechnung wurden die  $\Delta Ct$ -Werte verwendet. Die Top2b-Expressionsänderung wurde auf die Kontrolltiere (Cre<sup>-</sup>) bezogen, deren Top2b-Expression folglich auf 100% gesetzt wurde.

## 2.4.6 Proteinexpression und Quantifizierung mittels Western Blot

Die Deletion der Top2b auf Protein Ebene wurde mittels Western Blot ermittelt und von Frau X durchgeführt. Der Western Blot stellt eine Methode dar, mit der Proteine mittels Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und auf eine Trägermembran übertragen und dort über Antikörper Reaktionen sichtbar gemacht werden können.

### 2.4.6.1 Probenvorbereitung

Die Kardiomyozytenpellets wurden jeweils in 100 µl Lysepuffer (Tabelle 2.1) gelöst. Die Pellets lösten sich zum Teil sehr schlecht, sodass zum Aufschluss der Zellen 2\* für je 20 s sonifiziert wurde (Sonicator, Ultrasonic Processor XL, Heat Systems). Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Nach der Ultraschallbehandlung wurden die Proben bei nicht sofortiger Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

### 2.4.6.2 Proteinbestimmung mittels BCA-Assay

Für die Proteinbestimmung wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit #23225 (Thermo Scientific) verwendet. Das BCA-Reagenz enthält zweiwertige Kupferionen, die durch vorhandenes Protein zu einwertigem Kupfer reduziert werden können. Dieses gebildete einwertige Kupfer, dessen Menge proportional zur vorhandenen Proteinmenge ist, bildet mit der Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff, dessen Absorption photometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen werden kann. Die unbekannte Proteinkonzentration kann somit durch Vergleich mit bekannten Proteinkonzentrationen errechnet werden. Aus diesem Grund wird eine Standardreihe mit 8 verschiedenen Konzentrationen aus Rinderserumalbumin (BSA)-Standard 2 mg/ml (PAA) verdünnt in RIPA hergestellt (höchste Konzentration: 2,0 µg/µl). Auf eine 96 Well Platte wurden 10 µl dieser 8 Standardproben in Duplets aufgetragen. Aus den lysierten Pellets wurden ebenfalls 10 µl einer 1:10 Verdünnung (10 µl lysiertes Pellet+ 90 µl RIPA) in Duplets aufgetragen. In jedes Well wurden 200 µl des BCA-Reagenz (50:1, Reagenz A:B) hinzugegeben, die 96 Well Platte abgedeckt und 30 min bei 37°C in einem Inkubator (Heraeus) inkubiert. Im Anschluss wurde die Absorption von 562 nm in einem Photometer (Tecan, Sunrise, Tecan Deutschland GmbH) gemessen und die Proteinkonzentration anhand der Standardkurve mit dem Software Programm Magellan (Tecan, Sunrise, Tecan Deutschland GmbH) berechnet.

### 2.4.6.3 SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) und Tankblot

Nach der Proteinbestimmung wurde die SDS-Page und der eigentliche Western Blot in einem Mini-PROTEAN 3 Cell System von BioRad durchgeführt. Dazu wurden 20 µg

Protein mit 2\* Probenpuffer (Tabelle 2.1) vermischt und die Proben für 5 min bei 95°C denaturiert. Zur Auftrennung der Proteine wurde ein 4%-iges Sammelgel (Tabelle 2.1) und ein 6- und 12%-iges Trenngel (Tabelle 2.1) gegossen und das Gel bei 100 W konstant in 1\* Laufpuffer (Tabelle 2.1) laufen gelassen. Für p53 wurde ein 10%-iges Trenngel verwendet. Nachdem das Gel für 15 min in Blottingpuffer (Tabelle 2.1) äquilibriert worden war, wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Roth) mittels Tankblot überführt. Die Blotbedingungen waren konstant bei 4°C über Nacht mit 30 V und 90 mA.

#### **2.4.6.4 Antikörperinkubation und Detektion**

Im Anschluss wurde die Membran für 1 h bei RT mit 5% Milchpuffer (Tabelle 2.1) blockiert und mit dem ersten Antikörper inkubiert. Zum Nachweis der Top2b wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet, den wir freundlicherweise von Frau X aus Japan erhielten (Kawano *et al.*, 2010). Dieser Antikörper wurde 1:5000 mit 5% Milchpuffer verdünnt. Für die p53-Western Blots wurden die Antikörper von Santa Cruz (FL-393) und Cell Signaling (9284S) verwendet. Als interne Standards wurden GAPDH und  $\beta$ -Tubulin verwendet; der monoklonale GAPDH Antikörper (sc-32233, Santa Cruz) wurde 1:10.000 mit 5% Milchpuffer verdünnt;  $\beta$ -Tubulin (Sigma) wurde 1:40.000 in 5% Milchpuffer verdünnt. Es wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3\* für 10 min in TBS-T (Tabelle 2.1) gewaschen. Im Anschluss folgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper Anti-mouse-IgG (A6782, Sigma) für 1 h bei RT. Der Antikörper wurde dafür 1:20.000 mit 5% Milchpuffer verdünnt. Die Membran wurde danach nochmals 3\* für jeweils 10 min in TBS-T gewaschen. Die Detektion für die Top2b erfolgte mit einem ECL- Nachweisreagenz von Rockland nach den Angaben des Herstellers. GAPDH wurde mittels eines ECL-Reagenz von Biolabs entsprechend der Herstellerangaben nachgewiesen. Als Film wurde ein Film der Firma Amersham Biosciences verwendet, Entwickler- und Fixierungslösung waren von der Firma Kodak (1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnen).

#### **2.4.6.5 Quantifizierung der Top2b-Proteinmenge**

Die Quantifizierung der Top2b-Proteinmenge auf den Western Blots in den deletierten Tieren wurde mit der Image Lab<sup>TM</sup> Software (BioRad) durchgeführt. Es wurde ein Western Blot quantifiziert mit jeweils drei Cre<sup>-</sup>-Tieren und drei Cre<sup>+</sup>-Tieren, die zuvor mit TAM (3\*40 mg/kg) gespritzt wurden. Für die Quantifizierung wurde die Bande einer Cre<sup>-</sup>-Maus als Referenz definiert und die Größe der anderen Banden relativ zu dieser Referenzbande bezogen. Dies wurde sowohl für die Top2b-Banden als auch für die GAPDH-Banden durchgeführt. Im Anschluss wurde dann der Quotient aus der Expressionsänderung der Top2b mit dem entsprechenden Wert für GAPDH gebildet.

## 2.5 Kardiomyozytäre Transkriptomanalyse mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung

Für die NGS- (*Next Generation Sequencing*) Analyse wurde aus den isolierten Kardiomyozyten von Top2b-deletierten und nichtdeletierten Tieren 12 Tage nach der letzten TAM-Gabe RNA isoliert. Die einzelnen RNA-Proben wurden entsprechend ihres Genotyps zu gleichen Mengenteilen zusammengeführt. Die cDNA-Bibliotheken wurden von GENTERprise Genomics GmbH Mainz erstellt, die anschließende Hochdurchsatz-Sequenzierung durch das Institut für Molekulargenetik (Johannes Gutenberg-Universität Mainz) an einem Illumina HiSeq 2000 Gerät. Die biologischen Replikate stellten gleichzeitig auch technische Replikate dar, da sie an zwei verschiedenen Tagen sequenziert wurden. Für den jeweiligen Lauf wurden die beiden Proben des Replikats auf einer Lane einer Flowcell sequenziert. Die Sequenzfragmente wurden „paired-end“ sequenziert, d. h. vom 5′- sowie vom 3′-Ende, sodass jeweils zwei *reads* pro Sequenzfragment vorlagen (Sequenzlänge 101 bp). Die sequenzierten Proben ergaben zwischen 19 und 54 Millionen Sequenzfragmente.

### 2.5.1 Bioinformatische Datenanalyse der RNA-seq Daten

Alle Schritte der bioinformatischen Datenanalyse wurden an einem Rechner mit dem Betriebssystem Linux durchgeführt. Die Datenanalyse der RNA-seq-Proben wurde durch Frau X durchgeführt und ausgewertet. Die Rohdaten der Sequenzierung wurden im FASTQ-Format abgeholt. Es wurden zwei biologische Replikate sequenziert, wobei jedes Replikat aus einer Top2b-deletierten und aus einer nichtdeletierten RNA-Probe bestand.

#### 2.5.1.1 Qualitätskontrolle

Im ersten Schritt wurde eine Qualitätskontrolle der Rohsequenzdaten und der Basenzusammensetzung durchgeführt. Dies erfolgte mit dem Programm FastQC von The Babraham Institute (Cambridge, UK).

(<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>)

#### 2.5.1.2 Trimmen: Entfernen von Sequenzabschnitten

Trat eine fehlerhafte Basenzusammensetzung auf, mussten einzelne Sequenzabschnitte abgeschnitten werden. Dies erfolgte vom jeweiligen 5′-Ende der Sequenz. Bei den RNA-seq Daten wurden 1 - 2 Basen abgeschnitten. Bei dem verwendeten Programm handelte es sich um den FASTQ-Trimmer des FASTX-Toolkit (V0.0.13.1) (Cold Spring Harbor Laboratory, New York) ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)).

### 2.5.1.3 Mapping: Sequenzalignierung an das Genom

Im nächsten Schritt mussten die kurzen Sequenzen („reads“) an die Referenzsequenz aligniert werden (= Mapping). Als Referenzsequenz wurde die genomische Sequenz der Maus in der Version mm9 verwendet (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>). Das für die Alignierung verwendete Programm für die RNA-seq Datenauswertung heißt TOPHAT (V2.0.6). TOPHAT benutzt Bowtie (Bowtie 1 V0.12.8.0) und Samtools (V0.1.18.0), um die RNA-seq Daten an das Genom zu alignieren, und detektiert Splicevarianten zwischen den Exons. Für TOPHAT wurden die voreingestellten Parameter verwendet und die detaillierten Methoden 2012 näher beschrieben (Trapnell *et al.*, 2012). Bei den RNA-seq Proben konnten über 90% der reads aligniert werden. Die Anzahl der Reads pro Probe sowie die Anzahl der jeweils detektierten Gene sind im Anhang (Tabelle 6.1) dargestellt.

### 2.5.1.4 Cufflinks: Ermittlung der Expressionsstärke

Cufflinks ist ein Programm, das zunächst die alignierten Sequenzen zu Transkripten zusammenstellt und deren Häufigkeit abschätzt. Nach einer genauen Normalisierung kann die Anzahl an Sequenzfragmenten als Maß für die relative Häufigkeit der Transkripte benutzt werden. Cufflinks misst die Häufigkeit der Transkripte in „Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped“ (FPKM) (Informationen aus Cufflinks Manual). Die Expressionsstärke der einzelnen Gene wurde mit Cufflinks (V2.0.0) (University of California, Berkley, USA) berechnet.

### 2.5.1.5 Cuffdiff: Identifizierung differentiell exprimierter Gene

Cuffdiff wurde eingesetzt, um differentiell exprimierte Gene in den Top2b-deletierten Tieren vs. den Kontrolltieren zu identifizieren. Es wurde die Version 2.0.0 (University of California, Berkley, USA) des Programms verwendet. Zunächst wurde mittels Cufflinks die Expressionsstärke der Gene bestimmt und im Anschluss wurden signifikante Unterschiede zwischen den Proben herausgestellt. Waren nicht genügend Alignments zum Testen da, wurden diese Gene mit „NOTEST“ gekennzeichnet und für die spätere Analyse ausgeschlossen. Nur Gene, die innerhalb der Gruppen miteinander verglichen werden konnten und signifikante Unterschiede aufwiesen, wurden für die nachfolgende Analyse verwendet.

Die Signalweg-Analyse erfolgte mit dem Programm Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems). Es wurden nur Gene in die Analyse eingeschlossen, deren Expressionsstärke sich mindestens signifikant um das 2-fache von der Kontrollgruppe unterschieden.

## 2.6 Analyse der Top2b-DNA-Bindung mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Die Chromatin-Immunpräzipitationsanalyse ist eine Methode, um die Bindung eines ausgewählten Proteins „protein of interest“ an einer spezifischen DNA-Sequenz zu bestimmen. Die ChIP wurde an Ganzherzhomogenaten durchgeführt. Für die genomweite ChIP-Sequenzierung wurden ebenfalls DNA-Proben aus Ganzherzhomogenaten verwendet. Das vorliegende Protokoll wurde entwickelt und aus verschiedenen Protokollen zusammengestellt, die wir dankenswerterweise von Herrn X (IMB Mainz) und X (MPI für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim) erhielten. Zusätzlich wurde das Protokoll den Publikationen von Bolli et al., Dahl et al. und Schmidt et al. (Bolli *et al.*, 2013; Dahl and Collas, 2008; Schmidt *et al.*, 2009) angeglichen. Außerdem wurden uns durch Frau X (Head of Genomics, IMB Mainz) wichtige Tipps für die ChIP-Durchführung vermittelt.

### 2.6.1 Crosslink und Sonifizierung

Eine 5 - 7 Monate alte Maus wurde gewogen und kurz in Isofluran-Atmosphäre betäubt. Im Anschluss wurde sie durch zervikale Dislokation getötet und das Herz entnommen. Das Herz wurde zunächst in zwei Petrischalen mit Hank`s-Puffer gewaschen, abgetupft und in zwei gleich große Stücke (~50 mg) geschnitten. Zur Reproduzierbarkeit ist es wichtig, dass immer die gleiche Menge an Herzgewebe für den Versuch verwendet wird. Im Anschluss wurden die Herzhälften in zwei Petrischalen verteilt und mit zwei Rasierklingen in sehr kleine Stücke geschnitten (~1 mm<sup>3</sup>). Dieser Schritt erfolgte auf Eis. Daraufhin wurden zu jeder Herzhälfte 2 ml PBS + Proteinase Inhibitor (10 ml PBS+1 Tablette Proteinase Inhibitor (cOmplete Tablets, Mini EASYpack, Roche)) hinzugefügt und die Suspension mehrmals mit einer gelben Nadel (0,9\*40 mm) und einer 1ml Spritze hoch- und heruntergezogen, bis sich die hergestellte Suspension leichtgängig durch die Nadel spritzen ließ. Die Suspension wurde in ein 4 ml Gefäß (Cryo.s<sup>TM</sup>, greiner bio-one) überführt. Im Anschluss wurde sowohl die Spritze als auch die Platte nochmals mit 2 ml PBS+PI nachgespült und ebenfalls in das 4 ml Tube überführt. Der Crosslink erfolgte nun durch Zugabe von 267 µl 16% Formaldehyd (16% Formaldehyde Solution (w/v) Methanol-free, Thermo Scientific) für 5 min auf dem Überkopfschüttler (intelli-mixer, Neolab) bei Raumtemperatur. Durch Zugabe von 225 µl 2.5 M Glycin (AppliChem) wurde der Crosslink gestoppt. Dafür wurde wiederum für 5 min auf dem Überkopfschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Zentrifugationsschritt (5 min, 720 RPM, 4°C) folgte. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 4 ml PBS+PI gewaschen und nochmals zentrifugiert (5 min, 720 RPM, 4°C). Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 1 ml kaltem PBS+PI aufgenommen und in einen 1 ml Dounce Homogenizer

(Wheaton) überführt. Mit dem Dounce Homogenizer wurde homogenisiert, indem der Glaspistill 30\* von oben nach unten geführt wurde. Die Suspension wurde nun auf einen 100 µm Meshfilter (EASYstrainer<sup>TM</sup> greiner bio-one) gegeben und die filtrierte Lösung in ein 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (5 min, 250 RPM = 670 g, 4°C). Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 1 ml ChIP Cell Lysis Puffer+PI (Tabelle 2.1) aufgenommen und für 10 min bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die Suspension wurde im Anschluss im Mikroskop betrachtet, um die Anzahl der Kardiomyozyten beurteilen zu können. Es folgte wieder ein Zentrifugationsschritt und der Überstand wurde verworfen (5 min, 5000 RPM = 2710 g, 4°C). Das Pellet wurde in 300 µl Nucleic Lysis Puffer+PI (Tabelle 2.1) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Zwischenzeitlich wurde die Suspension gevortext, da das in dem Puffer enthaltene SDS auf Eis ausfallen kann. Die 300 µl Zellsuspension wurde nun für die Sonifizierung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und in einem Bioruptor® Plus von Diagenode für 12 Zyklen (30 s on, 30 s off, high) sonifiziert. Die Lösung wurde zentrifugiert (10 min, 14.000 RPM, 4°C) und der Überstand (ca. 300 µl) in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

## 2.6.2 Kontrolle der DNA-Fragmentgröße

100 ml der obigen Lösung wurden entnommen und 4 µl 5 M NaCl und 5 µl 20% SDS hinzugegeben. Der Reverse Crosslink erfolgte mit 2 µl einer RNase A-Lösung (10 mg/ml) (AppliChem) 30 min bei 37°C und mit 1 µl Proteinase K (20 mg/ml) für 2 h bei 65°C. Die DNA wurde schließlich mittels der Phenol-Chloroform/IAA (Isoamylalkohol) Methode isoliert. Die Fällung erfolgte entweder über Nacht bei -20°C oder für eine Stunde bei -80°C in 2 Volumen 100% Ethanol, 30 µl 3 M NaOAc pH 5,2 und 1,33 µl Glykogen (15 mg/ml). Danach wurde zentrifugiert (30 min, 16.000 g, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet in 250 µl 70% Ethanol gewaschen. Es wurde für weitere 15 min zentrifugiert und der gesamte Überstand verworfen. Das luftgetrocknete DNA-Pellet wurde in 30 µl 10mM Tris pH 8 aufgenommen und die DNA am Nanodrop gemessen. Im Anschluss wurde die Fragmentgröße mittels Agarosegelelektrophorese beurteilt. Auf das Gel wurden 1, 5 - 2,5 µg DNA in 6\* Ladepuffer und ein entsprechender DNA-Marker (100 bp) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V ~90 min. Die Größe der DNA-Fragmente konnte im Chemidoc (BioRad) durch Vergleich mit den Markerbanden beurteilt werden.

## 2.6.3 Immunpräzipitation

### 2.6.3.1 Preclearing und Präzipitation

Der Überstand (300 µl) aus 2.6.1 wurde nun 1:9 mit IP Dilution Puffer (Tabelle 2.1) verdünnt. Es wurden immer 4 Mäuse gleichzeitig bearbeitet, wobei zwei zusammengeführt



wurden. So wurden die 300  $\mu$ l Probe von 4 halben Herzen (= 2 Mäuse) zusammengefügt und 10.800  $\mu$ l IP Dilution Buffer hinzugegeben. Die Lösung wurde vermischt und dann in 4 Aliquots mit jeweils 3 ml in ein 5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) aufgeteilt. 40  $\mu$ l 50% Beads (Tabelle 2.1) wurden zum sogenannten Preclearing jedem Reaktionsgefäß hinzugegeben und bei 4°C 1 h auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Im Anschluss wurde zentrifugiert (2 min, 4.000 RPM, 4°C) und die Proben für 2 min auf Eis gelagert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1% dieser Lösung als Input in einem weiteren Reaktionsgefäß gesammelt. Der Input wurde bei -20°C gelagert. Zu der restlichen Lösung wurden 50  $\mu$ l (10  $\mu$ g) Top2b Antikörper (200  $\mu$ g/ml H-286, Santa Cruz) hinzugegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Der Versuch wurde auch mit einem weiteren Top2b Antikörper von Abcam (10  $\mu$ l Einsatz; 1 mg/ml, ab58442) ausgetestet. Für die p53-Bindung wurde pro ChIP 50  $\mu$ l eines p53-Antikörpers von Santa Cruz (FL-393) eingesetzt. Zur Ermittlung des Hintergrunds wurden immer wieder IgG-Kontrollen mitgeführt. In diesem Fall wurden anstatt des TOP2B Antikörpers, 2,5  $\mu$ l (1 mg/ml, upstate Millipore) IgG Antikörper verwendet.

### **2.6.3.2 Waschen des DNA-Protein-Antikörpergemisches und Trennung des Komplexes vom Antikörper**

Am nächsten Tag wurden nochmals 50  $\mu$ l 50% Beads jedem Reaktionsgefäß zugefügt und 3 h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Ein Zentrifugationsschritt folgte (2 min, 4.000 RPM, 4°C) und die Proben wurden für 2 min auf Eis gelagert. Der Überstand wurde verworfen und die Beads in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dies erfolgte mit 1 ml Lysepuffer + PI (Tabelle 2.1). Im Anschluss wurde in diesem Puffer für 5 min auf dem Überkopfschüttler bei RT inkubiert. Ein Zentrifugationsschritt folgte (2 min, 10.000 RPM, 4°C) und der Überstand wurde verworfen. Die Beads wurden ein zweites Mal im Lysepuffer inkubiert und schließlich wieder zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es folgten zwei Waschschrte nach dem gleichen Muster wie oben mit dem DOC Puffer (Tabelle 2.1).

Im Anschluss wurden die Beads mit 1 ml TE Puffer (Tabelle 2.1) in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt und der Überstand wurde sauber entnommen und verworfen.

Im nächsten Schritt wurden 150  $\mu$ l frisch hergestellter Elutionspuffer (Tabelle 2.1) zu den Beads hinzugegeben, 20 min auf dem Überkopfschüttler bei RT inkubiert und im Anschluss zentrifugiert (2 min, 11.000 RPM, RT). Der Überstand wurde in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Es wurden weitere 150  $\mu$ l Elutionspuffer zu den Beads hinzugegeben und nochmals inkubiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde ebenfalls in das zweite Reaktionsgefäß überführt (Endvolumen 300  $\mu$ l). Nun wurde der Input aufgetaut und auf 300  $\mu$ l mit Elutionspuffer aufgefüllt.

### 2.6.3.3 Reverse Crosslink und Fällung der DNA

Der Reverse Crosslink erfolgte mit 6  $\mu\text{l}$  RNase (10 mg/ml) für 30 min bei 37°C und mit 2  $\mu\text{l}$  Proteinase K (20 mg/ml) für 2 h bei 65°C. Die DNA wurde schließlich mittels der Phenol-Chloroform/IAA Methode isoliert. Die Fällung erfolgte entweder über Nacht bei -20°C oder für eine Stunde bei -80°C in 2 Volumen 100% Ethanol, 30  $\mu\text{l}$  3 M NaOAc pH 5,2 und 1,33  $\mu\text{l}$  GlycoBlue™ (15mg/ml) (Ambion). Danach wurde zentrifugiert (30 min, 16.000 g, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet in 250  $\mu\text{l}$  70% Ethanol gewaschen. Es wurde für weitere 15 min zentrifugiert und der gesamte Überstand verworfen. Das luftgetrocknete DNA-Pellet wurde in 10  $\mu\text{l}$  10 mM Tris pH 8 aufgenommen.

### 2.6.4 Herstellung der Proben für die Sequenzierung

Für die ChIP-seq Analyse wurden zwei biologische Replikate produziert (jeweils Input plus die dazugehörige IP-Probe). Jedes Replikat besteht aus einer DNA-Mischung von 4 Mäusen (=80  $\mu\text{l}$ ). Abbildung 2.5 zeigt das Zusammenfügen der Proben am Beispiel von 2 Mäusen. Die aus zwei Mäuseherzen gewonnene DNA-Lösung (40  $\mu\text{l}$ ) wurde mit den 40  $\mu\text{l}$  der anderen beiden Herzen zusammengefügt (final 80  $\mu\text{l}$ ), um die endgültige DNA-Menge zu erhöhen.

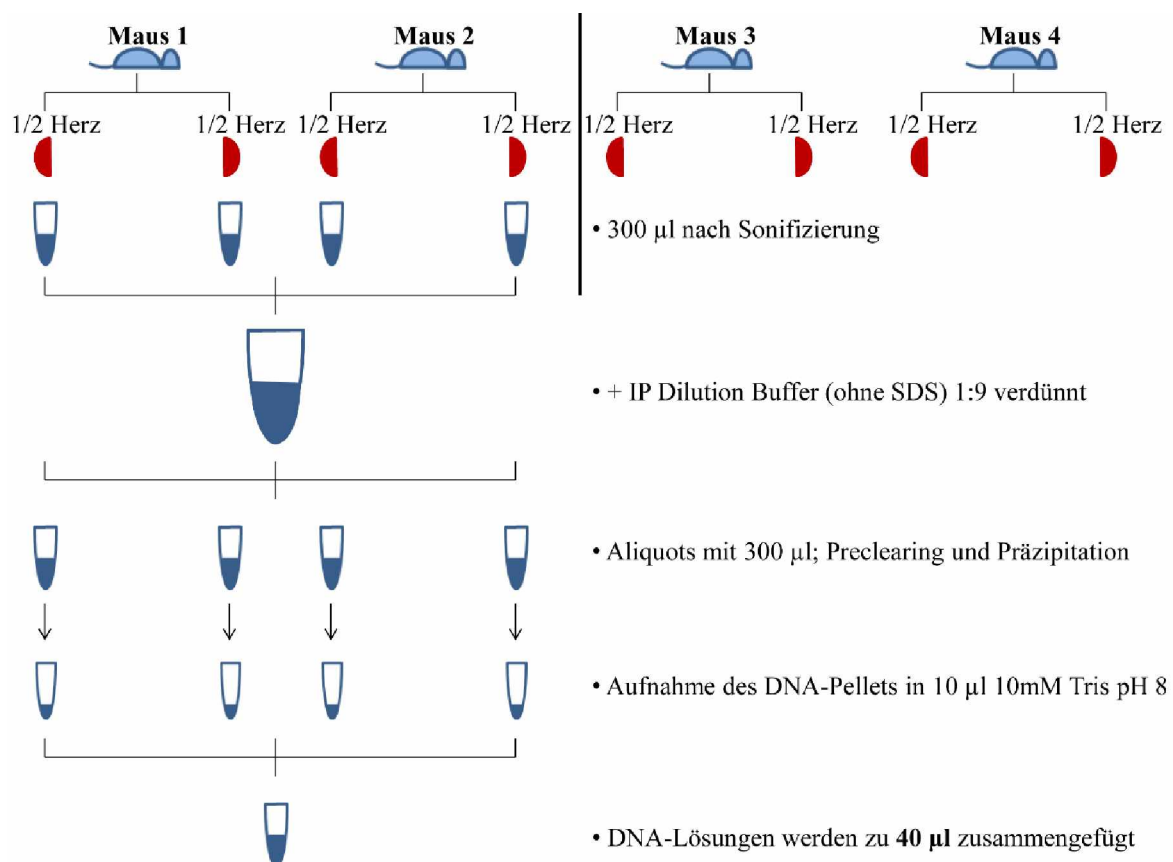


Abbildung 2.5 Übersichtsschema zur Herstellung der DNA-Proben für die genomweite Sequenzierung

Es wurden immer 4 Herzen parallel bearbeitet, wobei die Herzen in der Mitte halbiert wurden. Die Lösungen aus 4 Hälften wurden nach der Sonifizierung zusammengefügt und 1:9 mit IP Dilution Puffer verdünnt. Im Anschluss wurden von diesem Gemisch wieder 4 gleich große 300 µl Aliquots pipettiert. Es folgten das Preclearing und die Antikörperpräzipitation. Nach der DNA-Isolation und Aufnahme des DNA-Pellets in jeweils 10 µl 10 mM Tris pH 8 wurden die 10 µl der 4 Herzhälften zu 40 µl zusammengefügt. Am Ende wurden nun diese 40 µl mit den anderen 40 µl aus den anderen beiden Herzen ebenfalls zusammengefügt.

#### **2.6.4.1 Qubit®- Messungen, DNA-Fragmentlängenbestimmungen und Chromatin-Immunpräzipitationssequenzierung (ChIP-seq)**

Die Bestimmung der DNA-Konzentration mittels Qubit® und die Begutachtung der richtigen Fragmentgröße mit einem DNA-Gel von Agilent Technologies (Agilent 2100 Bioanalyzer, Verwendung des High Sensitivity DNA Kit) wurden durch Herrn X (TRON Translationale Onkologie an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz gGmbH) durchgeführt. Die Präparation der DNA-Bibliotheken und die Sequenzierung auf einem Illumina HiSeq 2000 Gerät wurden ebenfalls von TRON erledigt. Jos de Graf hat während der Etablierungsphase der ChIP-seq mehrere Qubit®-Messungen vorgenommen und mehrere DNA-Gele angefertigt.

Die 4 Proben der Replikate 1 und 2 wurden auf einer Lane einer Flowcell sequenziert. Die Sequenzfragmente wurden „paired-end“ sequenziert, d. h. vom 5´- sowie vom 3´-Ende, sodass jeweils zwei Sequenzfragmente („reads“) pro Sequenzfragment vorlagen (Sequenzlänge 50 bp). Die sequenzierten Proben ergaben zwischen 35 bis 66 Millionen Sequenzfragmente. Für die bioinformatische Datenanalyse wurden die beiden Replikate gemeinsam ausgewertet.

Alle Schritte der bioinformatischen Datenanalyse wurden an einem Rechner mit dem Betriebssystem Linux durchgeführt. Die Datenanalyse der ChIP-seq Daten wurde mit Hilfe von Frau X in Anlehnung an verschiedene Protokolle (Feng *et al.*, 2012; Mali Salmon-Divon, 2012) ausgewertet. Die gesamte Auswertung wurde von Marianne Mathäs begleitet. Die Rohdaten der Sequenzierung wurden im FASTQ-Format abgeholt. Eine Übersicht über die ChIP-seq Auswertung gibt Abbildung 2.6.

### **2.6.5 Bioinformatische Datenanalyse von ChIP-seq Daten**

#### **2.6.5.1 Qualitätskontrolle**

Im ersten Schritt wurde eine Qualitätskontrolle durchgeführt (siehe 2.5.1.1).

#### **2.6.5.2 Trimmen: Entfernen von Sequenzabschnitten**

Einzelne Sequenzabschnitte mussten bei fehlerhafter Basenzusammensetzung abgeschnitten werden (siehe 2.5.1.2). Bei den ChIP-seq Daten wurden 4 Basen abgeschnitten.

### 2.6.5.3 Mapping: Sequenzalignierung an das Genom

Für die Auswertung der ChIP-seq Daten wurde die genomische Sequenz der Maus in der neueren Version mm10 verwendet (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>). Das Mapping für die ChIP-seq Daten erfolgte mit Bowtie 2 (Langmead *et al.*, 2009). Die Bedingungen zum Ausführen des Programms waren so gewählt, dass nur Einmalbindungen der Sequenzfragmente (reads) an das Referenzgenom herausgefiltert werden. Hier konnten ca. 65% der reads an das Referenzgenom aligniert werden. Die ChIP-seq Sequenzfragmente und Bindungsstellen sind im Anhang (Tabelle 6.10) dargestellt.

### 2.6.5.4 Findung von Peaks und Annotation

MACS2 (Model-based Analysis of ChIPseq) ist ein Analysierungsprogramm, das prognostizierte Bindungsstellen in Form von Erhöhungen („Peaks“) angibt (Zhang *et al.*, 2008). Das Programm gibt an, auf welchem Chromosom der Peak liegt und wie lange der Peak ist, d. h., an welcher Position auf dem Chromosom er beginnt und an welcher Stelle er endet. Mit dem „Fold enrichment“ wird zusätzlich angegeben, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass genau an dieser Stelle wirklich eine Top2b-Bindung stattfindet.

PeakAnalyzer ist eine Ansammlung von Dienstprogrammen, die die ermittelten Top2b Bindungsstellen („Peaks“) nun an Genbereichen annotieren können (Salmon-Divon *et al.*, 2010). Dafür werden die durch MACS2 ermittelten Bindungsstellen überlappenden Genen zugeordnet, gleichzeitig wird die Entfernung in bp zu dem nächstliegenden Gen abwärts angegeben.

Im nächsten Schritt wurden mittels des Programms ngs.plot (next generation sequencing plot) die Top2b Bindungsstellen hinsichtlich ihrer Position im Vergleich zu den Transkriptionsstartseiten-Regionen (TSS) aller Gene des Mausgenoms (mm10) zugeordnet (<http://code.google.com/p/ngsplot/>).

Mittels des Integrative Genomics Viewer-Programms (IGV) ist es möglich die genomischen Bindungsdaten visuell zu explorieren (Robinson *et al.*, 2011; Thorvaldsdottir *et al.*, 2013).

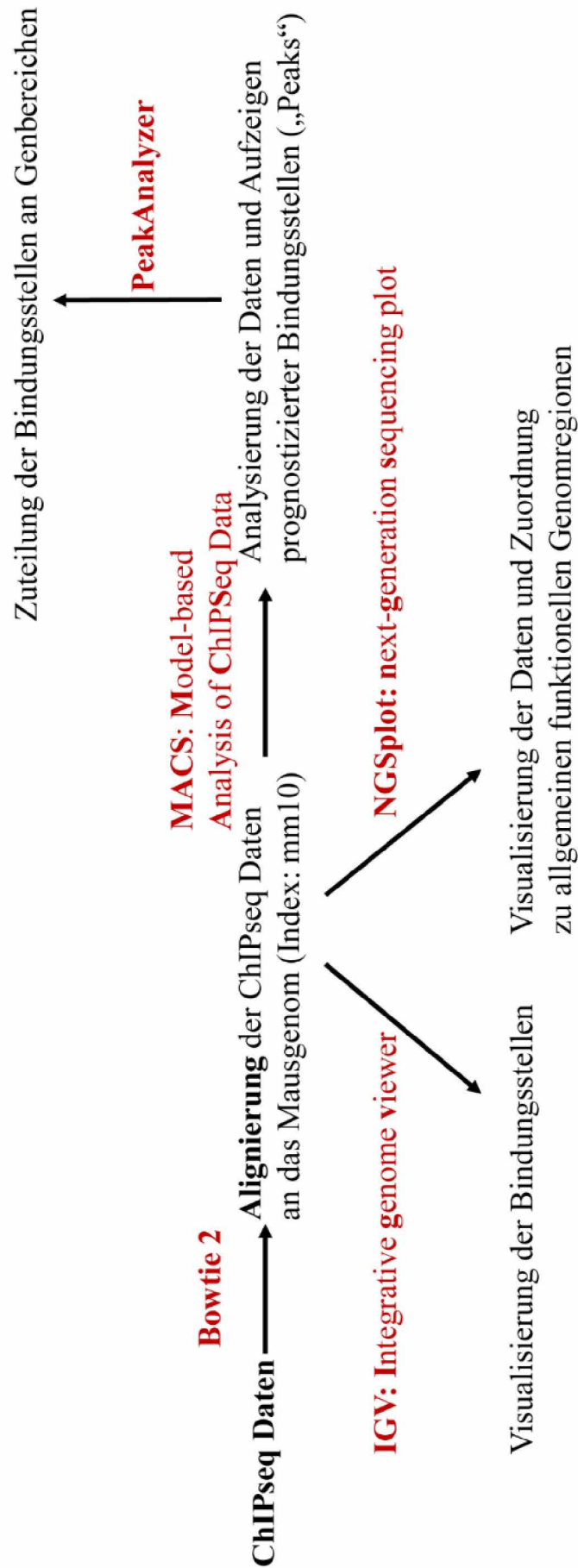


Abbildung 2.6 Schema der bioinformatischen Datenanalyse der ChIP-seq Daten

## 2.6.6 CHIP-qPCR

Die CHIP-Methode wurde ebenfalls auf ihre Funktionstüchtigkeit überprüft. Dies erfolgte unter Verwendung eines Antikörpers H3K4me3, der in Anlehnung an den Userguide von Abcam „A Beginner’s Guide to CHIP“ ausgewählt wurde. Bei dieser Modifikation ist das Lysin an Position 4 des Histons 3 trimethyliert. Die Durchführung der CHIP erfolgte mit 5 µl H3K4me3 Antikörper (1 mg/ml, 07-473 Millipore). Für die anschließende qPCR wurde in der Literatur nach Genen gesucht, von denen bekannt war, dass diese Histonmodifikation im Herz vorkommt und es wurden die in Stein et al. angegebenen Primersequenzen bestellt (Stein *et al.*, 2011) (Tabelle 2.2). Stein et al. konnte eine Bindung des H3K4me3-Antikörpers an drei verschiedene Stellen der KCHIP2-Promotorregion erkennen. Die quantitative PCR erfolgte nach bereits beschriebenem Protokoll. Für die CHIP-seq (Chromatin-Immunpräzipitations-Sequenzierung) Datenverifizierung wurden aus den MACS2-Ergebnissen (siehe 2.6.5.4) 9 Gene herausgesucht, an denen die Top2b am stärksten gebunden hat. Von den 9 Genen wurden Primer im Bereich der Top2b-Bindungsstelle entworfen. Gleichzeitig wurden Regionen identifiziert, in denen die Top2b nicht gebunden hat; diese Regionen sollten als negative Kontrollen dienen (Tabelle 2.2). Die isolierte DNA wurde im Anschluss mittels qPCR gemessen und die Top2b-Bindung mittels quantitativer PCR verifiziert. Für die Top2b-Bindung an den 11 Transkriptionsfaktoren wurden Primer in der Promotorregion (-500bp bis TSS) entworfen (siehe Tabelle 2.2). Für die p53-Bindung wurden Primer in Promotorregionen (-1000bp bis +150bp) von Col1a1, Tgfβ2 und Mmp2 entworfen (siehe Tabelle 2.2).

Graphisch dargestellt wird die Anreicherung der IP-Probe gegenüber der Input-Probe (siehe Ergebnisteil).

## 2.7 Funktionelle Untersuchung der deletierten Tiere

### 2.7.1 Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (MRT, engl. MRI magnetic resonance imaging) ist ein bildgebendes nicht invasives Verfahren zur Darstellung von Struktur, Anordnung und Funktion einzelner Organe in jeder Ebene (sagittal, axial, coronal). Die Technik beruht auf dem Prinzip der Kernspinresonanz (engl. NMR nuclear magnetic resonance). Die MRT Messungen wurden im Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim durch Frau X und Frau X durchgeführt. Die anschließende Auswertung wurde von Frau X begleitet und stichprobenhaft kontrolliert.

Die Mäuse wurden gewogen und mit Isofluran (1,7 - 2%) anästhesiert. Die Körpertemperatur der Tiere wurde während der gesamten Messung kontrolliert. Die Messungen erfolgten auf einem Bruker Pharmascan 7.0 T MRT-Scanner (Bruker) (Abbildung 2.7) nach bereits beschriebenem Protokoll (Schips *et al.*, 2011b).

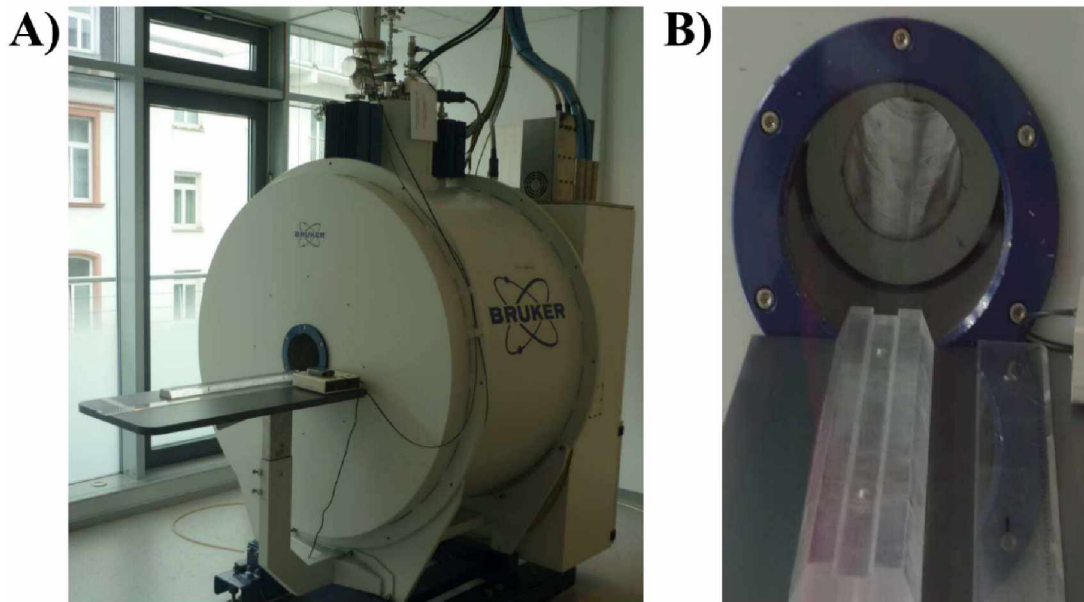


Abbildung 2.7 **Bruker Pharmascan 7.0 T MRT- Scanner für Kleintiere**  
(MPI Bad Nauheim)

Die MRT-Daten wurden mit der QMass imaging software (Medis), Version 7.1 analysiert. Es wurde nur der linke Ventrikel ausgemessen. Das Schlagvolumen (SV, Stroke volume) ist das Blutvolumen in ml/ $\mu$ l, das pro Herzschlag aus dem linken Ventrikel ausgeworfen wird. Es errechnet sich aus der Differenz zwischen enddiastolischem Volumen (LVEDV) und endsystolischem Volumen (LVESV) [SV= LVEDV-LVESV] (Stuckey *et al.*, 2008). Die Ejektionsfraktion (EF, Auswurfraction) ist das Blutvolumen in Prozent, das pro Herzaktion ausgeworfen wird. Die EF beschreibt die Veränderung des intrakardialen Volumens. Es errechnet sich aus dem Quotienten von SV und LVEDV\*100 (Angabe in Prozent) [EF= (LVEDV-LVESV)/LVEDV\*100] (Wiesmann *et al.*, 2002). Zur Reproduzierbarkeit wurden die MRT-Daten an verschiedenen Tagen mit mindestens 4 Wochen Pause dazwischen wiederholt.

## 2.7.2 Echokardiographie

Die Echokardiographie (Echo) ist ebenfalls ein nicht invasives bildgebendes Verfahren zur Darstellung von Anatomie, Struktur und Funktion des Herzens. Die Untersuchungen/Echokardiographien der Tiere wurden durch Herrn X, 2. Medizinische Klinik, Universitätsmedizin Mainz und von Frau X, Zentrum für Thrombose und Hämostase, Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

Die Tiere wurden vor den Messungen gewogen. Anschließend wurden die Tiere in einer Induktionskammer mit einem Inhalationsanästhetikum (Isofluran 3 - 4%) narkotisiert. Die Tiere wurden im Brustbereich enthaart und zum Erhalt der Normothermie auf einem Wärmeblock gelagert. Während der gesamten Messung wurden die Tiere gleichbleibend mit Isofluran (1,5 - 2,0%) betäubt. Die Messung erfolgte an einem Veve 770 (Visualsonics, Toronto, Canada) nach vorliegendem Protokoll (Reifenberg *et al.*, 2007).

Neben den bereits genannten funktionellen Parametern wurde die prozentuale systolische Verkürzungsfraction (Fractional Shortening: FS) bestimmt, die die Veränderung des kardialen Durchmessers beschreibt. Sie berechnet sich aus der Differenz des enddiastolischen Durchmessers des linken Ventrikels (EDD) und des endsystolischen Durchmessers des linken Ventrikels (ESD) multipliziert mit 100, geteilt durch den enddiastolischen Durchmesser (EDD).

Außerdem wurde der Quotient aus linksventrikulärer Masse (LVMasse) und Körpergewicht ermittelt. LVMasse berechnet sich aus

## **2.8 Histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen**

### **2.8.1 Histologische Untersuchungen an Paraffinschnitten**

#### **2.8.1.1 Probenvorbereitung**

Zur histologischen Untersuchung wurden die Mäuse kurz in Isofluran (Abbott)-Atmosphäre betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Das Herz wurde entnommen, indem es an der Herzspitze mit einer Pinzette gehalten und ein schneller Schnitt auf Höhe der Aorta gesetzt wurde. Das entnommene Herz wurde kurz in Hank's BSS (1\*)-Puffer (PAA) gewaschen und abgetupft. Im Anschluss wurden die mit-herausgeschnittenen Gefäße und die Aorta unter dem Mikroskop entfernt und das Herz mit zwei Rasierklingen auf der Transversalebene (Axialebene, Horizontalebene) gedrittelt. Das midventrikuläre Stück wurde zur histologischen Weiterverarbeitung verwendet, die restlichen Stücke wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und später bei -80°C gelagert. In den midventrikulären Schnitten waren sowohl der linke als auch der rechte Ventrikel vorhanden. In späteren Analysen wurde nur der linke Ventrikel untersucht und der rechte Ventrikel entfernt. Auch hier wurde das Herz wie oben beschrieben entnommen, anliegende Gefäße wurden abgetrennt und der rechte Ventrikel unter dem Mikroskop entfernt. Das midventrikuläre Stück wurde ebenfalls zur Weiterbearbeitung verwendet.



### 2.8.1.2 Fixierung und Einbetten der Proben

Als Fixierlösung wurde eine frischhergestellte phosphatgepufferte 4%-ige Paraformaldehydlösung verwendet. PFA (AppliChem) wurde am Vortag in 0,1 M Phosphatpuffer unter Rühren im Wasserbad bei ~70°C über mehrere Stunden gelöst und über Nacht lichtgeschützt abgekühlt. Die midventrikulären Schnitte fixierten lichtgeschützt über Nacht in 10 Volumen 4%-iger PFA-Lösung. Am nächsten Tag (nach ca. 24 h) wurden die fixierten Stücke automatisiert in einem Einbettautomat (Sakura Tissue Tek VIP E150/300, Sakura Finetek) eingebettet (Tabelle 2.8) und im Anschluss in 60°C warmen Paraffin mit dem Tissue Tek TEC (Sakura Finetek) ausgeblockt.

Die histologischen Untersuchungen wurden mit Hilfe der medizinisch-technischen Assistentinnen Frau X, X und X (Staatliche Lehranstalt für medizinisch-technische Laboratoriumsassistenten, Universitätsmedizin Mainz) durchgeführt. X, eine MTAL-Schülerin, etablierte in ihrem vierwöchigen histologischen Praktikum die Bedingungen zur Anfertigung der Schnitte und die Protokolle für die Hämatoxylin& Eosin-Färbung (H&E), die Masson-Goldner-Färbung (MG) und die Elastika-van-Gieson (EVG)-Färbung nach Hansen.

Tabelle 2.8 *Einbettprogramm 2 des Einbettautomats (Sakura)*

| <b>Einbettprogramm 2</b> |              |                   |
|--------------------------|--------------|-------------------|
| <b>Lösung</b>            | <b>Dauer</b> | <b>Temperatur</b> |
| <b>50% Isopropanol</b>   | 30 min       | 40°C              |
| <b>70% Isopropanol</b>   | je 45 min    |                   |
| <b>80% Isopropanol</b>   |              |                   |
| <b>96% Isopropanol</b>   |              |                   |
| <b>96% Isopropanol</b>   |              |                   |
| <b>100% Isopropanol</b>  |              |                   |
| <b>100% Ethanol</b>      |              |                   |
| <b>Xylol-Ersatz</b>      |              |                   |
| <b>Xylol-Ersatz</b>      |              |                   |
| <b>Xylol-Ersatz</b>      |              |                   |
| <b>Paraffin</b>          |              | je 60 min         |
| <b>Paraffin</b>          |              |                   |
| <b>Paraffin</b>          |              |                   |
| <b>Paraffin</b>          |              |                   |

### 2.8.1.3 Anfertigung histologischer Schnitte

Die Paraffinblöcke wurden am Vortag über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert. 20 min vor dem Schneiden wurden die Blöcke nochmals zusätzlich bei -20°C gelagert; sie konnten während der Schnittanfertigung immer wieder bei -20°C zwischengelagert werden. Je nachdem welche Färbung gemacht wurde, wurden unterschiedlich dicke Serienschnitte am Rotationsmikrotom CUT 5062 (Slee) angefertigt. Für die H&E-Färbung wurden Schnittdicken von 3 µm verwendet, für die Masson-Goldner- und Elastika-van-Gieson-Färbung 5 µm dicke Schnitte. Die Schnitte wurden auf Objektträger der Firma Roth (Objektträger Superfrost®, Roth) aufgezogen und die fertigen Objektträger bei 37°C im Brutschrank für 24 h getrocknet. Vor der jeweiligen Färbung wurden die Schnitte noch einmal kurz bei 70°C zum Ablaufen des Paraffins gelagert.

### 2.8.1.4 H&E-Färbung

Die H&E-Färbung ist eine Übersichtsfärbung mit den zwei Farbstoffen Hämatoxylin und Eosin. Hämatoxylin färbt basophile Strukturen (z. B. Zellkerne) blauviolett, Eosin acidophile (z. B. Zellplasmae, Kollagene) rot.

Die H&E-Färbung wurde in einem kontinuierlich arbeitenden Färbeautomat (Sakura) in der MTAL-Schule durchgeführt. Die einzelnen Küvetten wurden nach Angaben des Herstellers befüllt. Zuvor wurden die Objektträger zum Ablaufen des Paraffins für 25 min bei 70°C gelagert (15 min → beobachten → nochmals 10 min), für jeweils 7 min in zwei Xyloküvetten überführt und dann in den Automaten eingehängt. In jeder Küvette verblieben die Proben für 2 min. Für die saure Mayers Hämalaun Färbung wurden die Proben 4\* für jeweils 2 min in die Färbelösung getaucht. Für die Färbung mit Eosin (1%) wässrig wurden die Proben 1\* für 2 min in die Färbelösung getaucht. Zwischen den einzelnen Küvetten hingen die Proben für ca. 20 - 30 s an der Luft. Nach Beendigung der Färbung wurden die Objektträger nochmals für je 5 min in zwei verschiedenen Xyloküvetten gespült und schließlich mit Entellan (Merck) eingedeckt.

### 2.8.1.5 Masson-Goldner-Färbung

Die Masson-Goldner-Färbung ist eine Trichromfärbung mit den Farbstoffen Ponceau de Xylidine/ Säurefuchsin (Ponceau S), Phosphormolybdänsäure/ Organe G und Lichtgrün zur Sichtbarmachung kollagener Bindegewebsfasern.

Die Färbung erfolgte nach einem leicht auf unsere Schnitte abgeänderten Protokoll aus der MTAL-Schule. Es wurden lediglich die Inkubationszeiten für die Farbstoffe verändert und etabliert. Nach der Entparaffinierung wurden die Objektträger für 5 min in Weigert Eisenhämatoxylin, 6 min in Ponceau S, 7 min in Phosphormolybdänsäure/ Orange G und 7 min in Lichtgrün (nach 5 min Kontrolle im Mikroskop!) inkubiert. Es war wichtig, möglichst immer frisch angesetzte Lösungen zu nehmen, da aufgefallen war, dass die

Farben besonders gut zur Geltung kamen, je frischer die Farblösungen waren. Die Zellkerne wurden braunschwarz gefärbt, das Zytoplasma schwach orange, das Muskelgewebe blassrot und das Bindegewebe grün. Nach der Entwässerung wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckt.

#### **2.8.1.6 Elastika-van-Gieson-Färbung nach Hansen**

Die Elastika-van-Gieson-Färbung ist eine Färbung zur Sichtbarmachung elastischer und kollagener Bindegewebsfasern, sie kombiniert die van-Gieson-Färbung mit der Elastika-Färbung. Elastische Fasern werden dunkelviolett gefärbt und kollagenes Bindegewebe rot. Kerne sind braunschwarz und das Zytoplasma, Erythrozyten und Muskulatur gelb dargestellt. Als Farbstoffe dienen das Resorcin Fuchsin zur Darstellung elastischer Fasern und Pikrofuchsin (Pikrinsäure und Säurefuchsin) zur Darstellung kollagener Fasern und des Zytoplasmas. Die Elastika-van-Gieson-Färbung wurde von unserem Kooperationspartner Dr. med. Christoph Brochhausen und Kollegen routinemäßig im Institut für Pathologie, Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

Die angefärbten Schnitte wurden unter dem Keyence BZ-9000 Mikroskop (Keyence) in der 10- und 20-fachen Vergrößerung begutachtet und die Bilder fotografiert. Dies geschah im Rahmen unserer Kooperation mit dem Institut für Pathologie bei Dr. Roland E. Unger. Die semiquantitative Auswertung der Schnitte erfolgte mit dem Analyseprogramm BZ-II Analyzer von der Firma Keyence. Das Programm markiert und berechnet die Fläche des kompletten Schnittes und bezieht die Fläche der fibrotischen Bereiche anteilhaft darauf. Pro Tier wurde ein Schnitt ausgewertet. Die Auswertung wurde einmalig durchgeführt und von Frau X stichprobenhaft kontrolliert.

### **2.8.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen**

Elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Uwe Wolfrum im Institut für Zoologie, Zell- & Matrix-Biologie, Johannes Gutenberg Universität Mainz durchgeführt. Die chemische Fixierung für die Elektronenmikroskopie folgte dem im Labor üblichen Protokoll. Das Protokoll zur Konventionellen Fixierung für Elektronenmikroskopie (Fischer *et al.*, 2013) sowie benötigte Reagenzien wurden uns durch Frau X, der zuständigen MTA, ausgehändigt und zur Verfügung gestellt, Fixierung 1 und 2 wurden in unserem Institut durchgeführt, die Überführung und Einbettung in Araldit im Institut für Zoologie. Die weitere Aufarbeitung der Aralditförmchen und das Anfertigen von Semidünnschnitten (~1 µm) und Ultradünnschnitten (~50 nm) wurden von Frau X übernommen.

### 2.8.2.1 Aufbereitung, Fixierung und Einbettung der Gewebestücke

Die Tiere wurden mit Isofluran betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Das Herz wurde entnommen. Es wurde sofort für 5 - 10 Minuten in Fixativ I (Tabelle 2.1) gegeben und mit zwei Rasierklingen (Wilkinson) ein 2 mm großes Stück vom linken Ventrikel abgetrennt. Dieses Stück wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit Fixativ I (1,5 - 2,0 ml) für 1,5 - 2 h bei RT fixiert. Das restliche Herz wurde wie bereits beschrieben auf der Transversalebene gedrittelt, das midventrikuläre Stück für histologische Untersuchungen weiterverarbeitet und die anderen Stücke schockgefroren und bei -80°C gelagert. Nach der GA-Fixierung wurden die Stücke in Waschpuffer (Tabelle 2.1) 4\* für jeweils 15 min gewaschen und im Anschluss für 1 h bei RT mit 1 ml Fixativ II (Tabelle 2.1) nachfixiert. Die Schnitte wurden wiederum in Waschpuffer für 1 h gewaschen, wobei alle 10 - 15 min der Puffer gewechselt wurde. Im Anschluss folgte die Entwässerung für jeweils 10 min in 30% Ethanol, 50% Ethanol, 2\* 70% Ethanol, 80% Ethanol, 90% Ethanol, 2\* 95% Ethanol, 2\* 100% Ethanol. Die Gewebestücke wurden 2\* für jeweils 10 min in Propylenoxid (Serva) Intermedium inkubiert und im Anschluss über Nacht offen im Abzug in einem Propylenoxid:Aralditgemisch (1:1) (Tabelle 2.1) gelagert. In der folgenden Nacht wurden die Schnitte in ca. 4 ml reinem Aralditgemisch im Abzug gelagert und am nächsten Tag in Förmchen eingebettet und zur Polymerisation 2 Tage bei 60 - 65°C im Wärmeschrank polymerisiert.

### 2.8.2.2 Schneiden der Präparate und elektronenmikroskopische Untersuchungen

Semi- (~1 µm) und Ultradünnschnitte (~50 nm) wurden von Frau X an einem Ultracut S Microtome (Leica) angefertigt und die Ultradünnschnitte auf Kupfergrids aufgezogen. Die Semidünnschnitte wurden zunächst mit einem Mehtylenblau-Azur B Gemisch nach Richardson angefärbt und die Schnitte an einem Lichtmikroskop (Leica) begutachtet.

Nachdem die Kupfergrids mit Uranylacetat/Bleicitrat (nacheinander, Uranylacetat 2% in 50% Ethanol, Bleicitrat nach Sato) behandelt worden waren, konnten die ultrastrukturellen Untersuchungen der Gewebestücke an einem Transmissionselektronenmikroskop (Tecnai 12 BioTwin, FEI, Eindhoven, NL) durchgeführt werden. Bilder wurden in verschiedenen Vergrößerungen mittels einer SIS MegaViewIII SCCD Kamera (FEI) angefertigt.

## 2.9 Statistische Auswertungen

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism (Version 5.01) (Graphpad, San Diego, USA). Die jeweiligen Tests werden im Ergebnisteil benannt. Sie wurden nach Rücksprache mit Frau X, IMBEI

Universitätsmedizin Mainz, gewählt. Statistische Signifikanzen der Versuchsgruppe ( $Cre^+$ ) gegenüber der Kontrollgruppe ( $Cre^-$ ) wurden zu jedem Zeitpunkt mit einem Mann Whitney Test ermittelt (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ). Statistische Signifikanzen innerhalb einer Gruppe ( $Cre^-/Cre^+$ ) gegenüber dem jeweiligen Zeitpunkt 0 wurden ebenfalls mit einem Mann Whitney Test ermittelt (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ) [gilt nur für die Zeitpunkte 0, 1, 2, 4 und 8 Wochen]. Die Signifikanzen (in Form von Sternen) wurden für den Vergleich zwischen 0 und 8 Wochen in schwarzer Farbe dargestellt, da der Schwerpunkt auf dem Vergleich dieser beiden Zeitpunkte lag. Die Vergleiche für die anderen Zeitpunkte gegenüber dem Zeitpunkt 0 wurden in grauer Farbe dargestellt. Auch hier wurde ein Mann Whitney Test angewandt. Deskriptiv gesehen bedeuten die grauen Sterne auch Signifikanzen, sie sind im Folgenden aber lediglich als Hinweise zu betrachten.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Genotypisierung transgener Tiere

Die Genotypisierung erfolgte nach bereits beschriebenen Protokoll (2.3.3). Sowohl  $\alpha$ -MHC-MerCreMer-tragende Top2bflox/flox (Cre<sup>+</sup>)-Mäuse als auch Top2bflox/flox (Cre<sup>-</sup>)-Tiere sollten homozygot die LoxP-Seiten tragen (verwendete Primer: PR5+6), weshalb das Detektieren des Top2b-WT-Allels auszuschließen war (verwendete Primer PR3+PR1) (siehe Abbildung 2.4). Cre<sup>+</sup> WT-Tiere besitzen dagegen zwei Top2-WT-Allele und keine LoxP-Seiten. Für das Detektieren der Cre-Rekombinase wurden die aus Göttingen erhaltenen Primer eingesetzt.

Abbildung 3.1 zeigt das Genotypisierungsergebnis für die LoxP-Seiten und das WT-Allel. Das amplifizierte Produkt in der LoxP-Genotypisierung ist 490 bp groß und in Mäusen 1 - 25 erkennbar. Die Genotypisierung auf das WT-Allel zeigte wie erwartet keine Banden in den Mausproben.

Abbildung 3.2 zeigt die Genotypisierungsergebnisse für die Cre-Rekombinase. In dieser PCR war eine amplifizierte Bande bei 440 bp zu erwarten. Im Allgemeinen lag die Verteilung der Cre-Rekombinase-tragenden Mäuse bei ca. 50%. In dieser Genotypisierung waren 16 Mäuse von 25 Tieren Träger der Cre-Rekombinase.

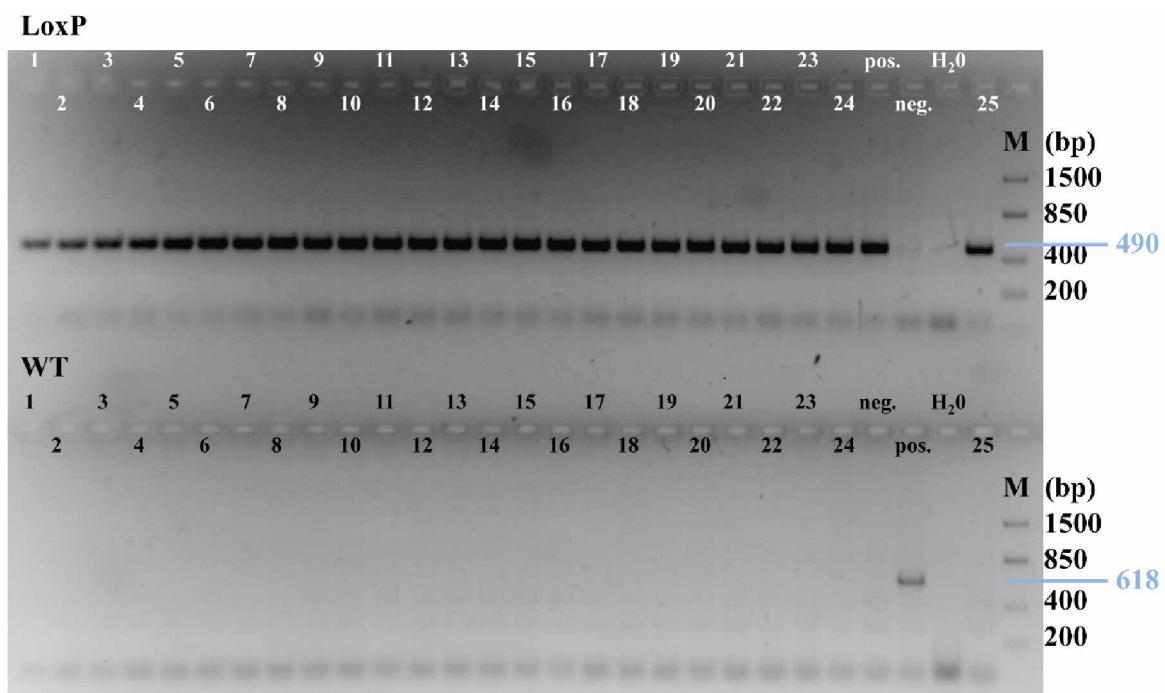


Abbildung 3.1 Gelelektrophoretische Darstellung der Genotypisierungs-PCR: LoxP und WT

Die Mäuse 1-25 wurden genotypisiert. Die positive Kontrolle ist mit pos. bezeichnet, die negative Kontrolle mit neg.. Es wurde ebenfalls eine Wasserprobe (H<sub>2</sub>O) mitgeführt. M zeigt den DNA-Marker zur Größenbestimmung der PCR-Produkte. Die obere Hälfte des Gelbildes zeigt die Genotypisierung der LoxP-Seiten. In den Proben 1 - 25 ist jeweils ein PCR-Produkt mit den Primern für die LoxP-Seiten entstanden, d. h., dass diese Tiere eine homozygot gefloخته Top2b tragen. In der unteren Hälfte des Gelbildes wird die Genotypisierung des WT-Allels der Top2b dargestellt. Wie zu erwarten, ist das WT-Allel der Top2b in den gefloختen Mäusen nicht vorhanden.

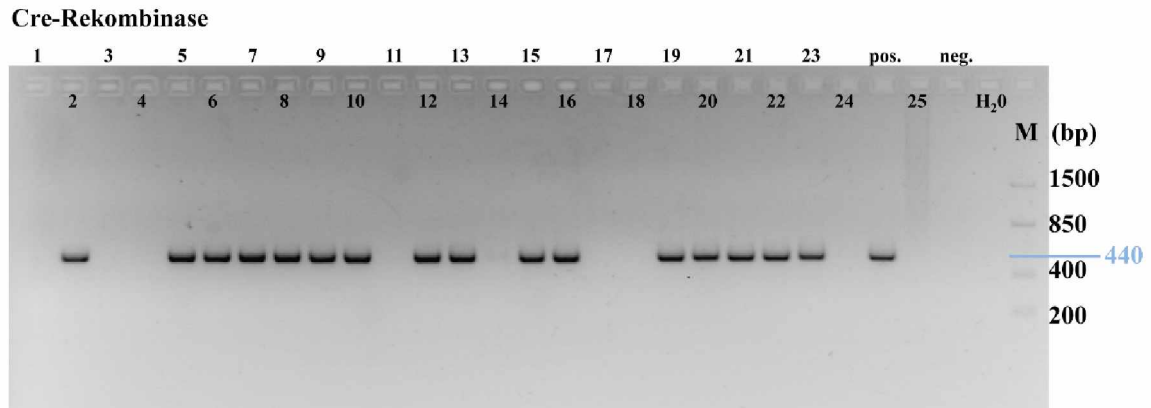


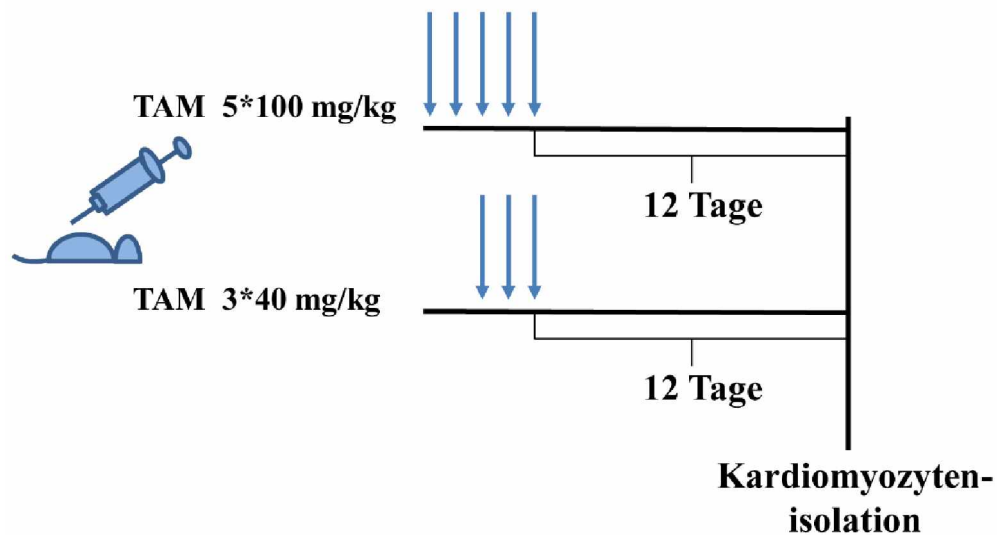
Abbildung 3.2 Gelelektrophoretische Darstellung der Genotypisierungs-PCR:

#### **Cre-Rekombinase**

Die Mäuse 1 - 25 wurden genotypisiert. Die positive Kontrolle ist mit pos. bezeichnet, die negative Kontrolle mit neg.. Es wurde ebenfalls eine Wasserprobe (H<sub>2</sub>O) mitgeführt. M zeigt den DNA-Marker zur Größenbestimmung der PCR-Produkte. Bei ungefähr der Hälfte der Tiere ist ein PCR-Produkt mit den Primern für die Cre-Rekombinase entstanden, in Folge dessen sind diese Tiere Träger des Cre-Transgens.

## **3.2 Tamoxifen induzierte Deletion der Top2b**

Zur Detektion des Top2b-Knockouts wurden insgesamt 7 Cre<sup>-</sup> - und 9 Cre<sup>+</sup>-Mäuse mit TAM behandelt. Es wurden drei Versuche durchgeführt, wobei in den ersten beiden Versuchen die Cre<sup>-</sup>-und Cre<sup>+</sup>-Mäuse mit je 100 mg/kg TAM an fünf aufeinanderfolgenden Tagen behandelt wurden. Im letzten Versuch wurden die Tiere mit einer geringeren Dosis an TAM behandelt (40 mg/kg an drei aufeinanderfolgenden Tagen) (siehe Abbildung 3.3). Das Ausmaß der Deletion wurde 7 bis 12 Tage nach der letzten TAM Injektion ermittelt.



**Abbildung 3.3 Zeitverlauf des TAM-induzierten Knockouts**

Cre<sup>-</sup>-Tiere (n= 4) und Cre<sup>+</sup>-Tiere (n= 6) wurden mit 100 mg/kg TAM an fünf aufeinanderfolgenden Tagen behandelt. Andere Cre<sup>-</sup>-Tiere (n= 3) und Cre<sup>+</sup>-Tiere (n= 3) wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit einer Konzentration von 40 mg/kg TAM behandelt. Die Kardiomyozytenisolation erfolgte 7 bis 12 Tage nach der letzten TAM-Injektion.

### 3.2.1 Deletion auf mRNA-Ebene

Aus den isolierten Kardiomyozyten wurde RNA extrahiert, diese in cDNA umgeschrieben und das Ausmaß der Deletion mittels quantitativer PCR (TaqMan Assay) bestimmt.

Es konnte ein Ausmaß der Top2b-Deletion auf mRNA-Ebene von 71,09% festgestellt werden (Abbildung 3.4). Für die Berechnung der Top2b-Deletion wurden die Mäuse aus den zwei Behandlungsarmen (Abbildung 3.3) gemeinsam analysiert, da in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass das Ausmaß der Top2b-Deletion für beide TAM-Behandlungen vergleichbar war.



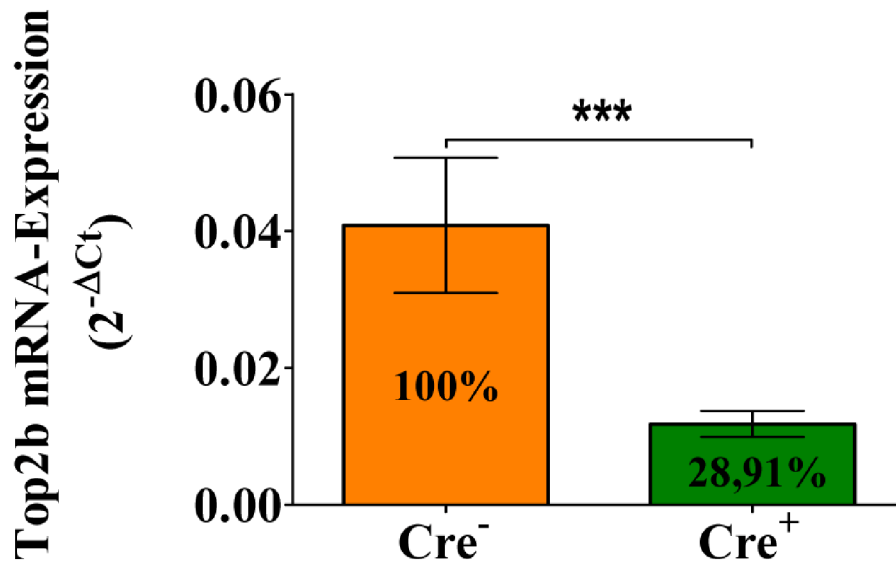


Abbildung 3.4 *Top2b* mRNA-Expression nach TAM-induzierter *Top2b*-Deletion bezogen auf Cre<sup>-</sup>-Mäuse

Die RNA wurde aus den isolierten Kardiomyozyten von Cre<sup>-</sup>-Mäusen (n= 7 [n= 4 für 5\*100 mg/kg TAM, n= 3 für 3\*40 mg/kg TAM]) und Cre<sup>+</sup>-Tieren (n= 9 [n= 6 für 5\*100 mg/kg, n= 3 für 3\*40 mg/kg]) gewonnen. Nach reverser Transkription wurde die *Top2b* mRNA-Expression mittels TaqMan PCR und  $\Delta C_t$ -Methode quantifiziert und auf die 18srRNA normalisiert. Die y-Achse stellt die 2<sup>- $\Delta C_t$</sup>  Werte dar (Mittelwert mit Standardfehler). Die *Top2b*-Expressionsänderung der deletierten Tiere wird im Vergleich zu den Kontrolltieren (Cre<sup>-</sup>) dargestellt (Angaben in %). Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe (Cre<sup>-</sup>) wurde mit einem Mann Whitney Test ermittelt (\*\*\*) p<0,001). Die Standardabweichungen sind im Anhang (Tabelle 6.3) dargestellt.

## 3.2.2 Deletion auf DNA-Ebene

### 3.2.2.1 Qualitativer Nachweis

Ein qualitativer Nachweis der *Top2b*-Deletion auf DNA-Ebene wurde an 4 Mäusen durchgeführt. Dafür wurde aus den isolierten Kardiomyozyten genomische DNA isoliert und das Ausmaß der Deletion mittels qualitativer PCR bestimmt. Die Lokalisation der Primer sind in Abbildung 2.4 dargestellt, sie entstammten einer Publikation von Lyu et al. (Lyu and Wang, 2003).

Abbildung 3.5 zeigt, dass die Deletion der *Top2b* erfolgreich war. An 4 Mäusen (Nummer 1 und 2 sind Cre<sup>+</sup>-Tiere, 3 und 4 sind Cre<sup>-</sup>-Tiere) konnte vergleichbar zur Genotypisierungs-PCR mit den Primerpaaren 5 und 6, die Anwesenheit der LoxP-Seite (stromabwärts) verifiziert werden. Mit den Primerpaaren 3 und 7 konnte nur bei vorliegender *Top2b*-Deletion ein Produkt entstehen, was bei Nummer 1 und 2, passend zum vorliegenden Genotyp, der Fall war. Mit den Primerpaaren 5 und 7, sowie 5 und 6 konnte gezeigt werden, dass die Deletion nicht vollständig verlaufen ist.

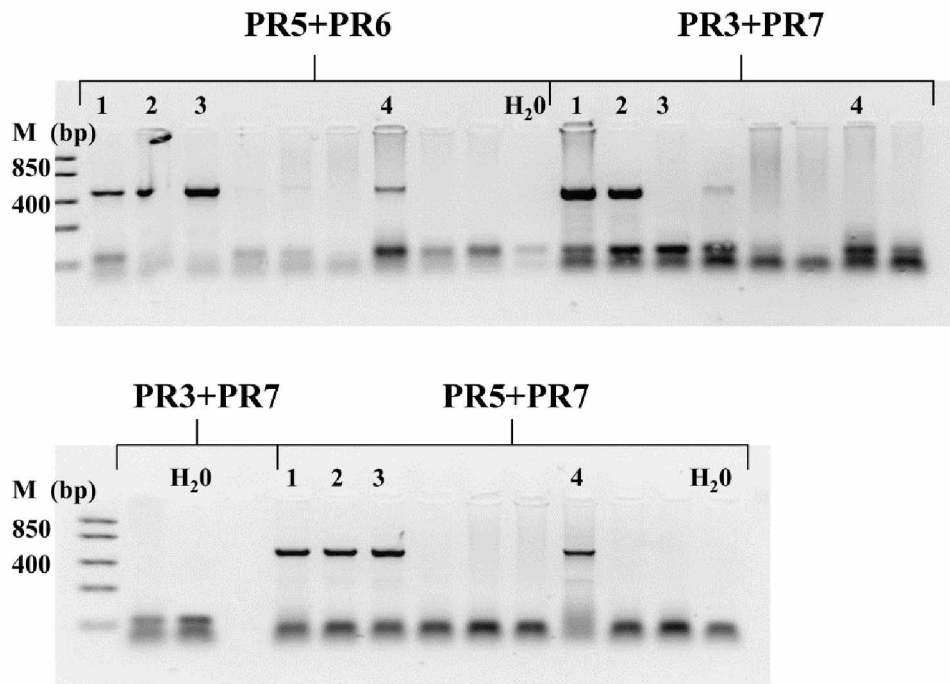


Abbildung 3.5 Gelelektrophoretische Darstellung zur qualitativen Detektion der *Top2b* Deletion

Qualitativ wurde die *Top2b*-Deletion an 4 Mäusen (1 - 4) untersucht. DNA wurde aus den isolierten Kardiomyozyten von  $Cre^{-}$ -Mäusen ( $n= 2$  für 5\*100 mg/kg TAM) und  $Cre^{+}$ -Tieren ( $n= 2$  für 5\*100 mg/kg) gewonnen und das Ausmaß der *Top2b*-Deletion mittels qualitativer PCR bestimmt. Die Mäuse 1 und 2 waren  $Cre^{+}$ -Tiere, die Mäuse 3 und 4  $Cre^{-}$ -Tiere. Es wurde eine Wasserprobe ( $H_2O$ ) mitgeführt. M zeigt den DNA-Marker zur Größenbestimmung der PCR-Produkte.

### 3.2.2.2 Quantitativer Nachweis

Aus den isolierten Kardiomyozyten wurde genomische DNA isoliert und das Ausmaß der Deletion unter Verwendung von PR10+11 mittels quantitativer PCR bestimmt.

Es konnte ein Ausmaß der *Top2b*-Deletion auf DNA-Ebene von 64,35% festgestellt werden (Abbildung 3.6). Für die Berechnung der *Top2b*-Deletion wurden die Mäuse aus den zwei Behandlungsarmen (Abbildung 3.3) gemeinsam analysiert, da in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass das Ausmaß der *Top2b*-Deletion für beide TAM-Behandlungen vergleichbar war.

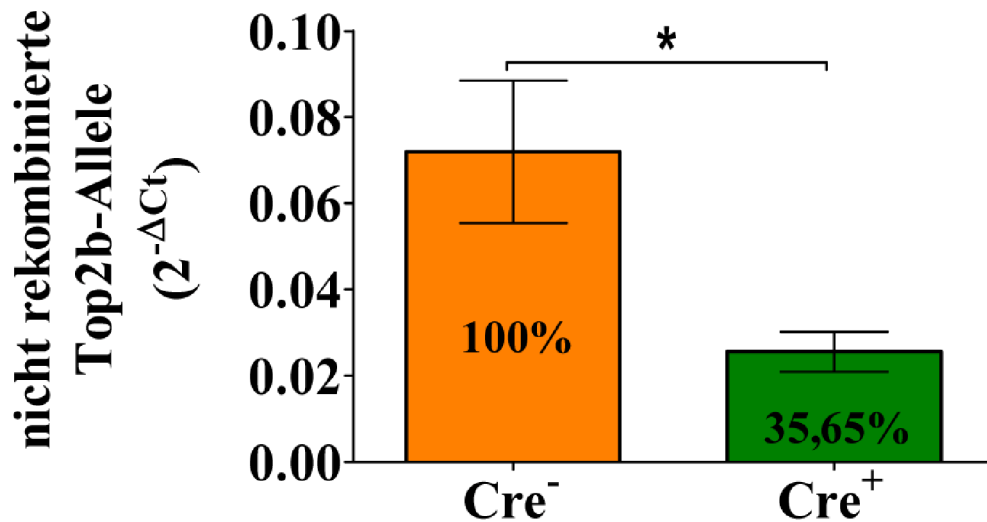


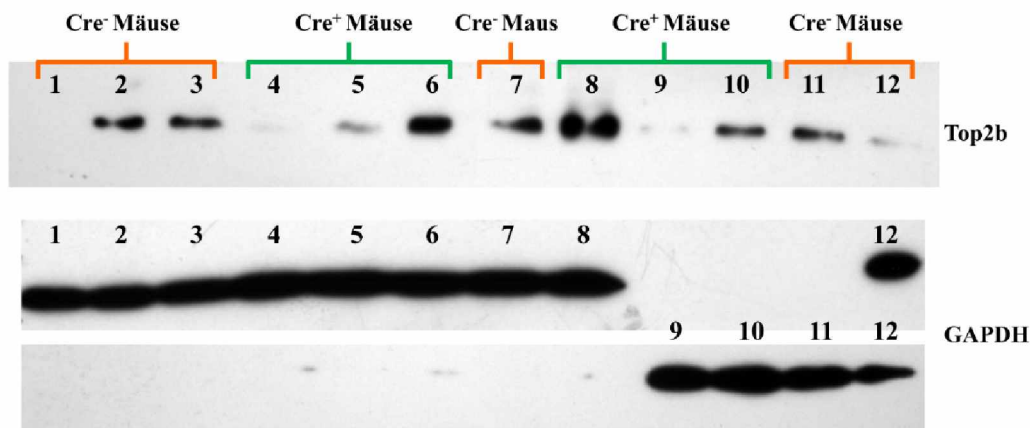
Abbildung 3.6 Nicht rekombinierte Top2b-Allele bezogen auf Cre<sup>-</sup>-Mäuse

DNA wurde aus den isolierten Kardiomyozyten von Cre<sup>-</sup>-Mäusen (n= 5 [n= 2 für 5\*100 mg/kg TAM, n= 3 für 3\*40 mg/kg TAM]) und Cre<sup>+</sup>-Tieren (n= 7 [n= 4 für 5\*100 mg/kg, n= 3 für 3\*40 mg/kg]) gewonnen. Das Ausmaß der Top2b-Deletion auf DNA-Level wurde mittels Sybr Green PCR und  $\Delta Ct$ -Methode quantifiziert und auf die 18srRNA normalisiert. Die y-Achse stellt die  $2^{-\Delta Ct}$  Werte dar (Mittelwert mit Standardfehler). Die nicht rekombinierten Top2b-Allele der deletierten Tiere werden im Vergleich zu den Kontrolltieren (Cre<sup>-</sup>) dargestellt (Angaben in %). Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe (Cre<sup>-</sup>) wurde mit einem Mann Whitney Test ermittelt (\* p<0,05). Die Standardabweichungen sind im Anhang (Tabelle 6.3) dargestellt.

### 3.2.3 Deletion auf Protein-Ebene

Nachdem eine erfolgreiche Deletion der Top2b auf mRNA- und DNA-Ebene gezeigt werden konnte, sollte eine Abnahme der Top2b auch auf Proteinebene bestätigt werden. Die Western Blot Analysen wurden von Frau X ausgeführt.

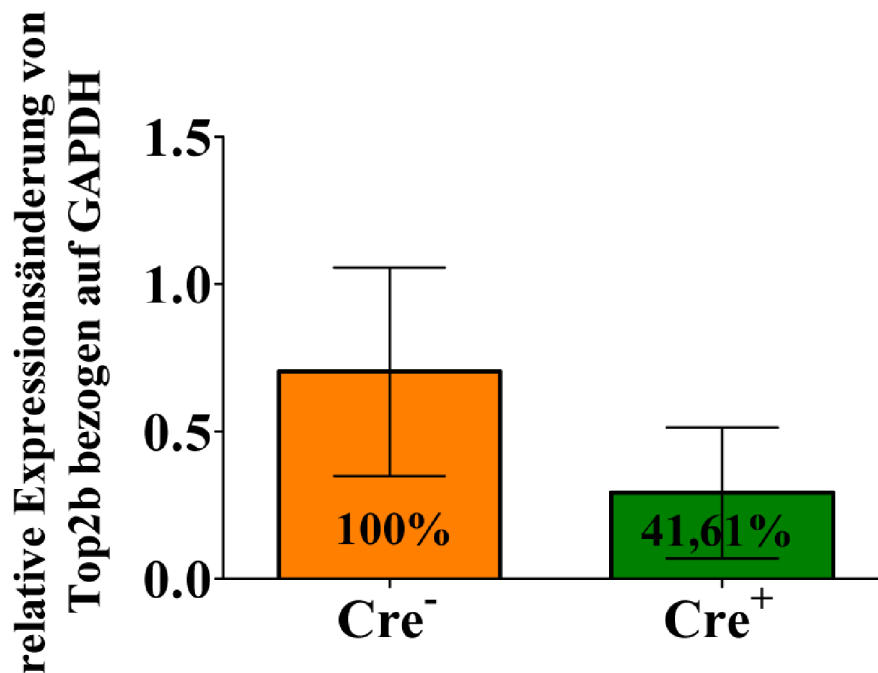
Aus den isolierten Kardiomyozyten wurde zu diesem Zweck Protein gewonnen und das Ausmaß der Deletion mittels Western Blot bestimmt. Zur Vereinfachung wurden die Tiere nummerisch sortiert. Abbildung 3.7 zeigt die Top2b-Proteinexpression von jeweils 6 Cre<sup>-</sup>- und 6 Cre<sup>+</sup>-Tieren, die mit 3\*40 mg/kg TAM (Nummern 1, 2, 3, 4, 9, 10) oder mit 1\*40 mg/kg TAM behandelt wurden (Nummern 5, 6, 7, 8, 11, 12). Zusammenfassend ist trotz eines sehr inhomogenen Bildes zu sagen, dass die Top2b-Bande (180 kDa) bei den Cre<sup>+</sup>-Tieren, die mit 3\*40 mg/kg TAM behandelt wurden (Nummern 4, 9 und 10), schwächer ist, als die Bande bei den deletierten Tieren, die mit 1\* 40 mg/kg TAM behandelt wurden (Nummern 5, 6, 8). Dies spricht dafür, dass der induzierte Knockout mit einmaliger TAM-Administration nicht effektiv war. Die Top2b-Bande bei den nichtdeletierten Tieren ist bei den Nummern: 2, 3 und 7 stärker im Vergleich zu den deletierten Tieren, die dreimal mit 40 mg/kg TAM behandelt wurden.



**Abbildung 3.7 Top2b-Proteinexpression von Top2b-deletierten und nichtdeletierten Tieren**

Protein wurde aus den isolierten Kardiomyozyten von Cre<sup>-</sup>-Mäusen (n= 6 [n= 3 für 3\*40 mg/kg TAM, n= 3 für 1\*40 mg/kg TAM]) und Cre<sup>+</sup>-Tieren (n= 6 [n= 3 für 3\*40 mg/kg, n= 3 für 1\*40 mg/kg]) gewonnen. GAPDH (37 kDa) diente als Ladungskontrolle und interner Standard. Da die Antikörper-Reaktion für GAPDH auf Grund methodischer Probleme nicht vollständig war (fehlende Banden) wurde der Blot nochmals gestrippt und ein zweites Mal mit dem GAPDH-Antikörper inkubiert; die Banden wurden mit einem anderen ECL Reagenz sichtbar gemacht (siehe Banden 9 - 12).

Im Anschluss wurde der Western Blot aus Abbildung 3.7 quantifiziert, wobei allerdings nur die Top2b-Proteinänderung von Tieren beurteilt wurde, die dreimal mit TAM behandelt wurden. In Folge dessen wurden 3 Cre<sup>-</sup>-Tiere und Cre<sup>+</sup>-Tiere semiquantitativ analysiert, indem die dritte Bande (Cre<sup>-</sup>-Maus) aus dem Western Blot (Abbildung 3.7) als Referenzbande genommen und die Größe aller anderen Banden auf diese bezogen wurde. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.8 dargestellt. Aufgrund der geringen Tierzahl wurde keine Statistik erstellt. Diese Quantifizierung diente nur dem Verdeutlichen der Deletion, die auf Grund des inhomogenen Blots eventuell nicht eindeutig erscheinen mag. Die Proteinmenge der Kontrolltiere wurde auf 100% gesetzt und der direkte Vergleich zeigte eine Reduktion des Top2b-Proteins in den deletierten Tieren auf 41,61%.



**Abbildung 3.8 Relative Expressionsänderung von Top2b-Protein nach TAM-induzierter Deletion bezogen auf GAPDH**

Für die Quantifizierung wurde Protein aus den isolierten Kardiomyozyten von Cre<sup>-</sup>-Mäusen (n= 3 für 3\*40 mg/kg TAM) und Cre<sup>+</sup>-Tieren (n= 3 für 3\*40 mg/kg) gewonnen. Es wurde ein Western Blot gemacht, wobei GAPDH als Ladungskontrolle und interner Standard diente. Für die Quantifizierung wurde die Bande einer Cre<sup>-</sup>-Maus als Referenzbande definiert und die Größe der anderen Banden relativ zu dieser Bande bestimmt. Dies wurde sowohl für die Top2b-Bande als auch für die GAPDH-Bande durchgeführt. Im Anschluss wurde dann der Quotient aus der Expressionsänderung der Top2b mit dem entsprechenden Wert für GAPDH gebildet; dieser ist im dargestellten Schema auf der y-Achse aufgetragen. Da die Tierzahl mit jeweils drei Tieren sehr gering war, wurde keine statistische Analyse durchgeführt.

In einem weiteren Western Blot konnten die oben gezeigten Ergebnisse verifiziert werden. Aus den isolierten Kardiomyozyten wurde zu diesem Zweck Protein gewonnen und das Ausmaß der Deletion mittels Western Blot bestimmt. Zur Vereinfachung wurden die Tiere erneut nummerisch sortiert. Abbildung 3.9 zeigt die Top2b-Proteinexpression von jeweils 2 Cre<sup>-</sup>- und 2 Cre<sup>+</sup>-Tieren, die 5\* mit TAM (5\*100 mg/kg) behandelt wurden. Die Proteinexpression der Cre<sup>-</sup>-Mäuse wird dargestellt als 1.1 und 1.2, sowie als 3.1 und 3.2, jeweils aufgetragen als Duplet. Dementsprechend sind die Mäuse 2.1/2.2 und 4.1/4.2 Cre<sup>+</sup>-Mäuse. Es konnte gezeigt werden, dass die Top2b-Bande in den deletierten Tieren schwächer ausfiel als in den Tieren der Kontrollgruppe.

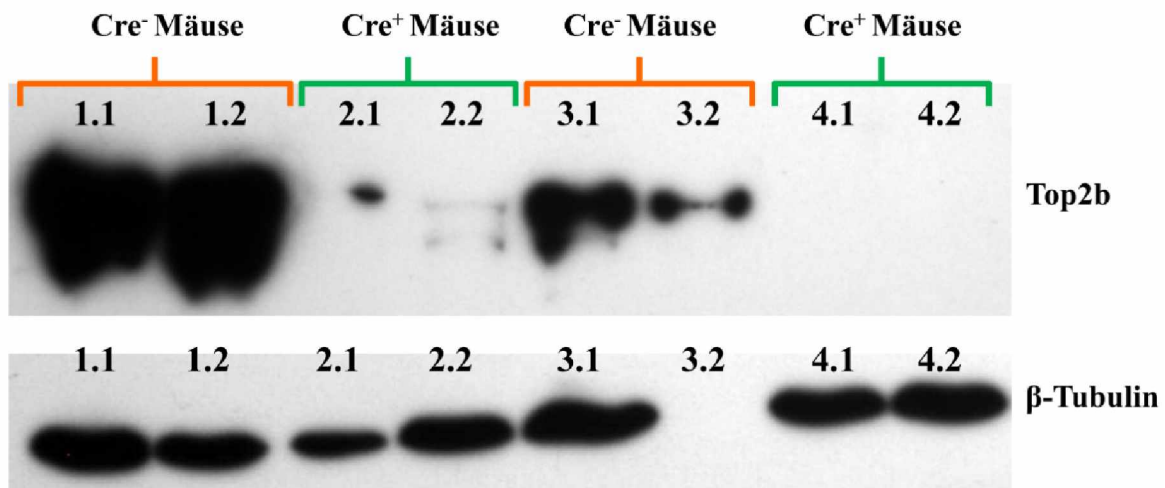


Abbildung 3.9 *Top2b*-Proteinexpression von *Top2b*-deletierten und nichtdeletierten Tieren

Protein wurde aus den isolierten Kardiomyozyten von Cre<sup>-</sup>-Mäusen (n= 2 [n= 2 für 5\*100 mg/kg TAM]) und Cre<sup>+</sup>-Tieren (n= 2 [n= 2 für 5\*100 mg/kg]) gewonnen.  $\beta$ -Tubulin (55 kDa) diente als Ladungskontrolle und interner Standard.

### 3.3 Manifestierte Kardiomyopathie nach Deletion der *Top2b*

#### 3.3.1 Verschlechterte Herzfunktion nach *Top2b*-Deletion (Magnetresonanztomographie)

Nachdem das Ausmaß der *Top2b*-Deletion auf RNA, DNA und Proteinebene verifiziert und quantifiziert worden war, sollten mittels MRT- und Echo-Untersuchungen funktionelle Herzparameter bestimmt werden. Mögliche vorliegende funktionelle Unterschiede der *Top2b*-deletierten Tieren (Cre<sup>+</sup>) sollten im Vergleich zu den Kontrolltieren (Cre<sup>-</sup>) beurteilt werden.

Zu diesem Zweck wurden die Versuchstiere (n= 7 für Cre<sup>-</sup> und n= 4 für Cre<sup>+</sup>) ins MPI nach Bad Nauheim transportiert. Abbildung 3.10 zeigt den zeitlichen Verlauf des Versuchs. Es wurde eine initiale Herzfunktionmessung (MRT Nr. 1, Zeitpunkt 0) durchgeführt. Im Anschluss wurden die Tiere von den dortigen Tierpflegern mit TAM (5\*100 mg/kg) behandelt. 8 Wochen sowie 16 Wochen nach der TAM-Administration wurden eine zweite und dritte Herzfunktionmessung durchgeführt (MRT Nr.2 und 3).

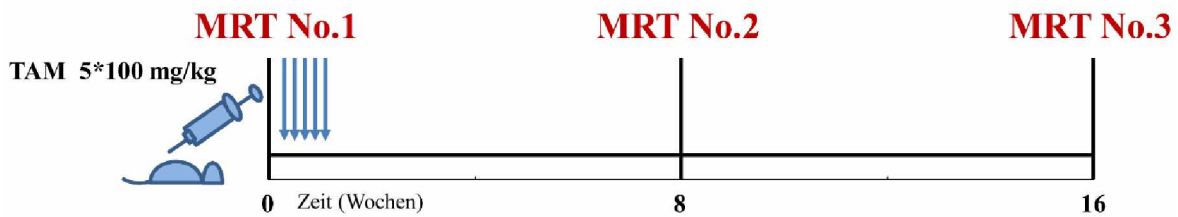


Abbildung 3.10 Schematische Darstellung des Versuchsverlaufs der magnetresonanztomographischen (MRT) Untersuchungen

Die initiale Herzfunktion wurde von Mäusen ( $n=7$  Cre<sup>-</sup>,  $n=4$  Cre<sup>+</sup>) bestimmt. Im Anschluss wurden die Tiere mit TAM ( $5 \times 100$  mg/kg) behandelt; nach 8- und 16-wöchiger Pause wurde jeweils eine erneute Herzfunktionsmessung durchgeführt.

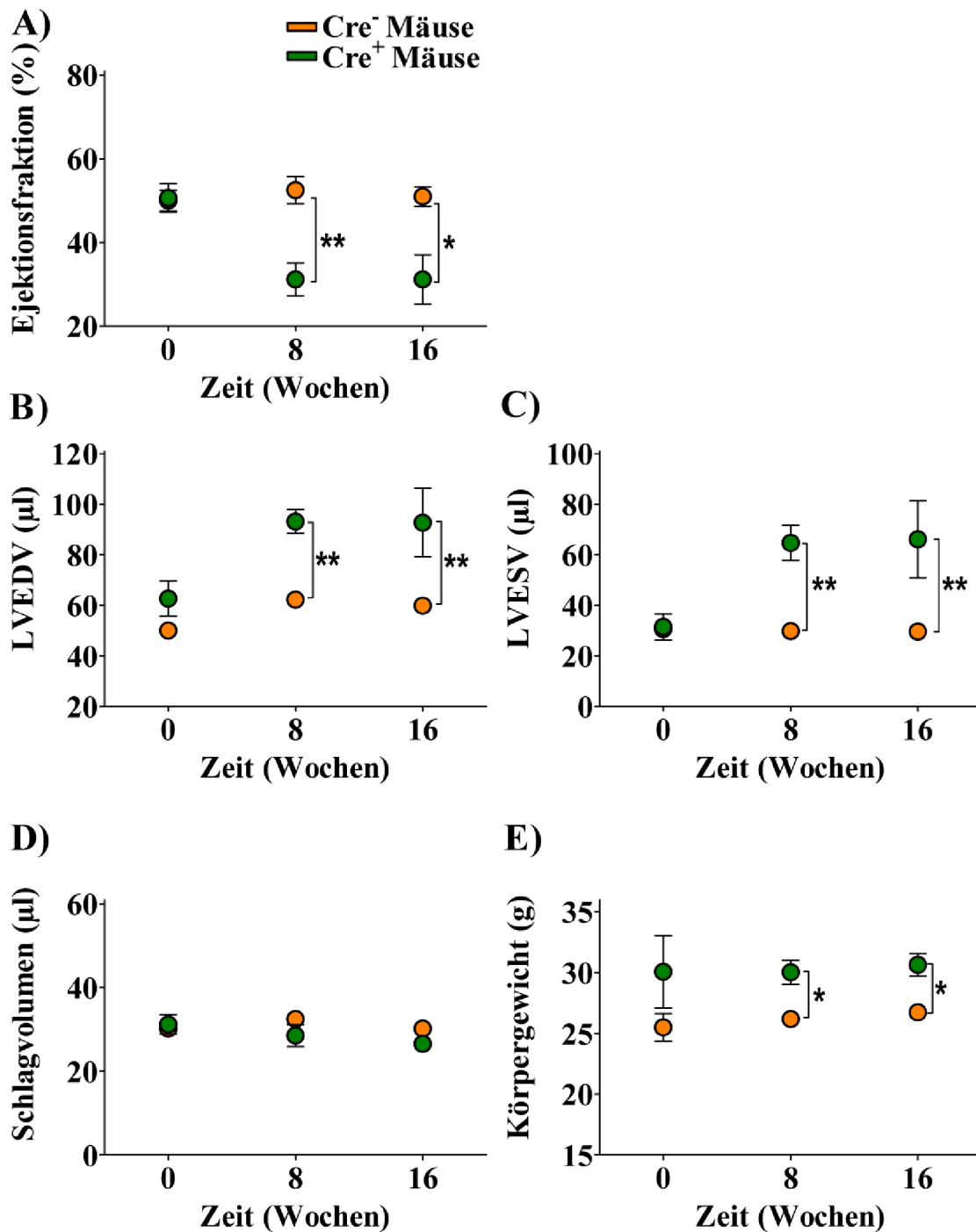
Abbildung 3.11 A zeigt die EF-Werte (%) von Kontrolltieren (Cre<sup>-</sup>), farblich markiert als orange gefüllte Kreise, gegenüber den EF-Werten von Cre<sup>+</sup>-Tieren (grün gefüllte Kreise) initial (vor Gabe von TAM) und 8 bzw. 16 Wochen nach der Initiierung der Top2b-Deletion. Statistische Signifikanzen konnten aufgrund der geringen Tierzahl nur durch direkten Vergleich von Cre<sup>+</sup>-Tieren mit Cre<sup>-</sup>-Tieren für einen bestimmten Zeitpunkt ermittelt werden. Ein vollständiger Vergleich zwischen beiden Gruppen im Verhältnis zu den drei Zeitpunkten konnte aufgrund der geringen statistischen Power nicht erstellt werden.

Es ist festzuhalten, dass sich die EF in den Kontrolltieren in dem angegebenen Zeitraum von 16 Wochen nicht veränderte. Allerdings verschlechterte sich die EF der Top2b-deletierten Tiere beginnend nach 8 Wochen drastisch. Statistische Auswertungen ergaben signifikante Abnahmen der EF-Werte von Top2b-deletierten Tieren 8 und 16 Wochen nach TAM-Gabe im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen.

Neben der signifikanten Abnahme der EF in den Top2b-deletierten Tieren konnten ein starker Anstieg des LVEDVs sowie eine etwas schwächere Zunahme des LVESVs verzeichnet werden. Auch diese Veränderungen im LVEDV und LVESV gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe erwiesen sich als statistisch signifikant zum Zeitpunkt 8 und 16 Wochen. Die LVEDV und LVESV der Kontrolltiere waren nicht verändert (siehe Abbildung 3.11 B und C).

Hinsichtlich des Schlagvolumens der Tiere (Abbildung 3.11 D) zeigten sich über die Zeitspanne hinweg keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Die Körpergewichte der beiden Tiergruppen veränderten sich während des Versuchs ebenfalls nicht (Abbildung 3.11 E).

Diesen gemessenen Parametern liegt die Tatsache zu Grunde, dass Top2b-deletierte Tiere 8 Wochen nach Implementierung der Deletion eine dilatative Kardiomyopathie entwickelt haben.



**Abbildung 3.11 MRT-Untersuchung der kardialen Funktion**

Die Herzfunktion wurde an Mäusen (n= 7 Cre<sup>-</sup>, n= 4 Cre<sup>+</sup>) initial (Zeitpunkt 0) sowie 8 und 16 Wochen nach der TAM-Applikation bestimmt. Die EF (A), das LVEDV (B), das LVESV (C), das Schlagvolumen (D) und das Körpergewicht (E) wurden für jedes Tier bestimmt und ausgewertet. Die orange markierten Punkte in den Graphen zeigen die Daten der Kontrolltiere (Cre<sup>-</sup>), die grün markierten die Daten der Versuchsgruppe (Cre<sup>+</sup>). Statistische Signifikanzen gegenüber der Kontrollgruppe (Cre<sup>-</sup>) wurden zu jedem Zeitpunkt mittels Mann Whitney Test bestimmt (\*\* p<0,01; \* p<0,05). Die Standardabweichungen sind im Anhang (Tabelle 6.4) angegeben.



Die zur Verifizierung und Erweiterung der MRT-Ergebnisse durchgeführten Echos wurden von Dr. med. Moritz Brandt und Tanja Schönfelder vorgenommen.

### 3.3.2 Verschlechterte Herzfunktion nach Top2b-Deletion (Echokardiographie)

Nach deutlichen Anzeichen einer entwickelten dilatativen Kardiomyopathie in den Top2b-deletierten Tieren 8 Wochen nach Implementierung der Deletion sollten frühere Zeitpunkte (bezogen auf die Top2b-Deletion) echokardiographisch untersucht werden. Dafür wurden fünf Zeitpunkte gewählt, wobei für jeden Zeitpunkt je 4 Cre<sup>-</sup>-Tiere und 4 Cre<sup>+</sup>-Tiere mit TAM (3\*40 mg/kg) behandelt wurden. 8 Wochen, 4 Wochen, 2 Wochen oder 1 Woche später (berechnet auf die **erste** TAM Injektion, siehe Abbildung 3.12 A) wurden die Tiere echokardiographisch untersucht. Für den letzten Zeitpunkt 0 wurden die Tiere 3 Tage mit TAM gespritzt und am Tag der letzten Injektion ebenfalls echokardiographisch begutachtet. Abbildung 3.12 A zeigt den zeitlichen Verlauf des Versuchs.

In einem weiteren Experiment wurden 18 Cre<sup>-</sup>-Tiere und 17 Cre<sup>+</sup>-Tiere ebenfalls mit TAM (3\*40 mg/kg) behandelt, aber erst nach 11 Wochen (bezogen auf die **erste** TAM Injektion) echokardiographisch überprüft (siehe Abbildung 3.12 B).

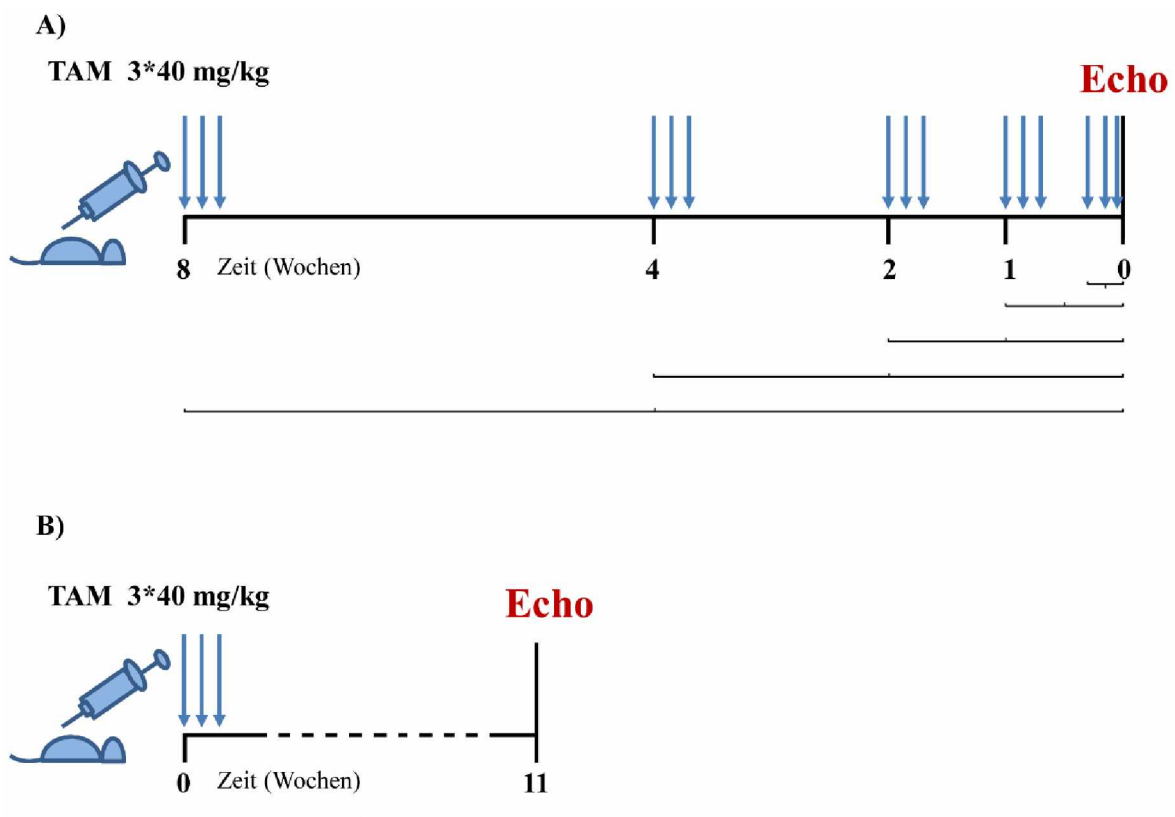


Abbildung 3.12 Schematische Darstellung des Versuchsverlaufs der echokardiographischen (Echo) Untersuchungen

Die Herzfunktion der TAM-behandelten Mäuse (3\*40 mg/kg) wurde nach verschiedenen langen Zeitspannen analysiert. (A) Zur Beurteilung der Progression der Kardiomyopathie wurden Cre<sup>-</sup>-

Tiere (n= 4 pro Zeitpunkt) und Cre<sup>+</sup>-Tiere (n= 4 pro Zeitpunkt) 3 Tage mit TAM (3\* 40 mg/kg) behandelt und entweder 8 Wochen später, 4 Wochen, 2 Wochen, 1 Woche oder am Tag der letzten Injektion (Tag 0) echokardiographisch untersucht. (Für die Analyse wurden pro Zeitpunkt unterschiedliche Mäuse verwendet) (B) In einem weiteren Experiment wurden Cre<sup>-</sup>-Tiere (n= 18) und Cre<sup>+</sup>-Tiere (n= 17) mit TAM (3\* 40 mg/kg) behandelt und 11 Wochen später echokardiographisch überprüft.

Abbildung 3.13 A zeigt die EF (%) und B die FS (%) von Kontrolltieren (Cre<sup>-</sup>), farblich markiert als orange gefüllte Punkte, gegenüber der EF und FS von Cre<sup>+</sup>-Tieren (grün gefüllte Symbole) am Tag 0 der Top2b-Deletion und 1, 2, 4 bzw. 8 Wochen danach (berechnet auf die **erste** TAM Injektion). Sowohl bei der graphischen als auch bei der statistischen Auswertung wurden die beiden Zeitverlaufsexperimente (1 - 8 Wochen und 11 Wochen) separiert voneinander betrachtet.

Innerhalb der Kontrollgruppe (Cre<sup>-</sup>) ist weder in der EF noch in der FS eine signifikante Änderung über den angegebenen Zeitverlauf von 8 Wochen zu erkennen. Die EF- und FS-Werte der Top2b-deletierten Tiere zeigten hingegen 8 Wochen nach TAM-Gabe eine signifikante Abnahme im Vergleich zum Zeitpunkt 0. Darüber hinaus waren die EF- und FS-Werte der deletierten Tiere im Vergleich zu den Werten der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 8 Wochen signifikant verringert (siehe Abbildung 3.13 A, B). Zu den vorigen Zeitpunkten 1, 2 und 4 Wochen nach der Deletion konnten keine signifikanten Änderungen festgestellt werden.

In dem zweiten Experiment manifestierten sich die signifikant verschlechterte EF und FS in Top2b-deletierten Tieren auch noch 11 Wochen nach Implementierung der Deletion (siehe Abbildung 3.13 A, B).

Abbildung 3.13 C, D zeigt die graphische Auswertung des LVEDVs und des LVESVs. In den Top2b-deletierten Tieren konnte eine signifikante Zunahme sowohl des LVEDVs als auch des LVESVs zum Zeitpunkt 8 Wochen im Vergleich zum Zeitpunkt 0 verzeichnet werden. Gleichzeitig konnten signifikante Zunahmen des LVESVs zu den Zeitpunkten 8 und 11 Wochen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen detektiert werden.

Das Schlagvolumen (Abbildung 3.13 E) veränderte sich zwischen beiden Gruppen zu einem bestimmten Zeitpunkt nicht. Erst 11 Wochen nach der Induktion der Deletion war eine signifikante Abnahme des Schlagvolumens in den deletierten Tieren sichtbar. Im Zeitverlauf war für die Kontrolltiere nach 8 Wochen eine signifikante Veränderung des Schlagvolumens zu erkennen.

Das Körpergewicht veränderte sich während der gesamten Versuchsdurchführung nicht (Abbildung 3.13 F). Die Gewichte der Tiere zum Zeitpunkt 11 Wochen waren zwar erhöht, dieser Effekt betraf jedoch beide Gruppen und ist auf das höhere Alter der Tiere im Vergleich zum anderen Experiment zurückzuführen.

Abbildung 3.13 G zeigt den Quotienten aus der linksventrikulären Masse (LVMasse) und dem Körpergewicht. Es konnte eine signifikante Abnahme des Quotienten in der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 8 verglichen mit Zeitpunkt 0 festgestellt werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die signifikanten Änderungen der funktionellen Herzparameter aus den MRT-Untersuchungen durch die echokardiographischen Messungen bestätigt werden konnten.

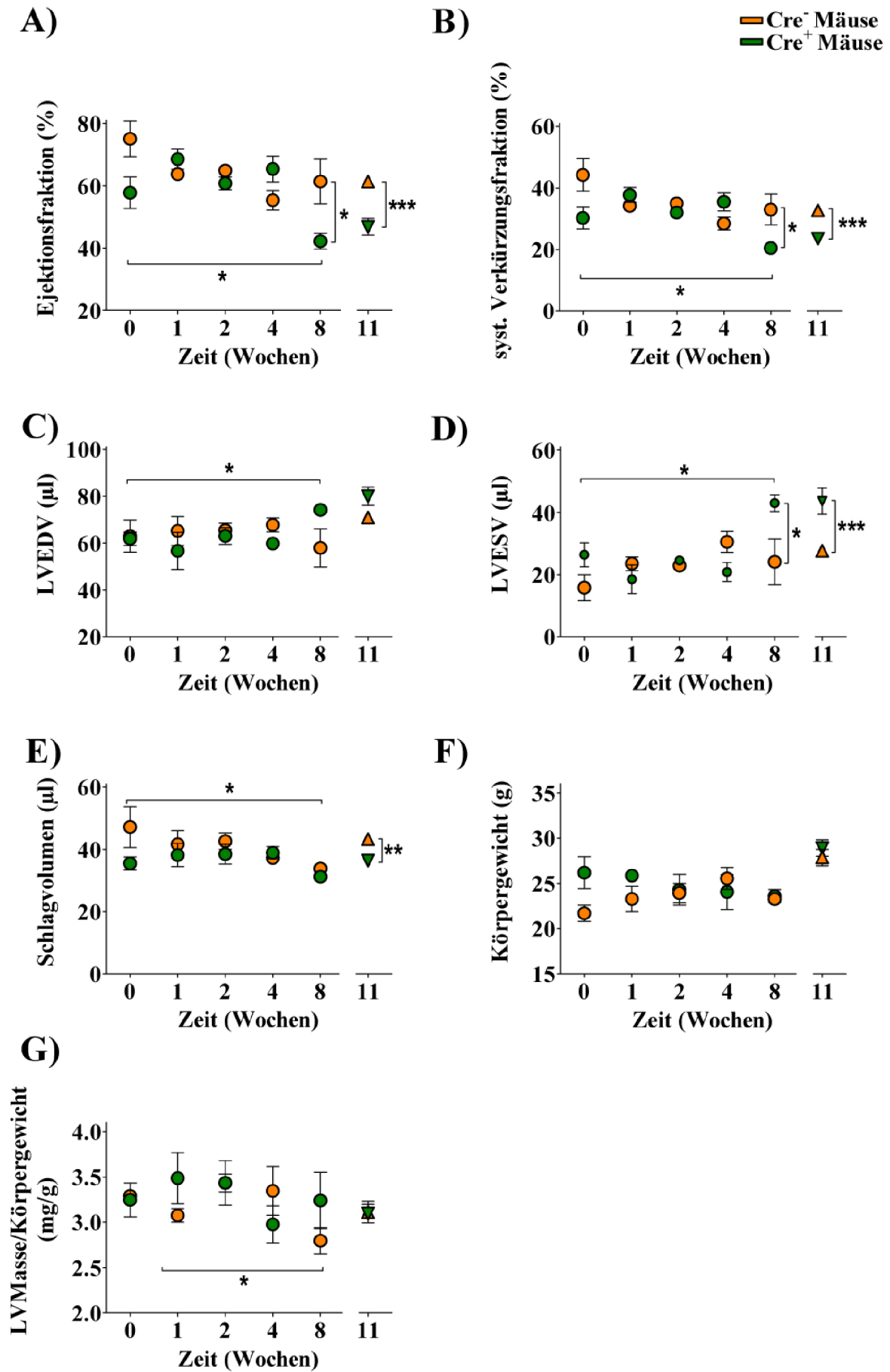


Abbildung 3.13 Echokardiographische Untersuchung der kardialen Funktion

Für die Zeitpunkte 0, 1, 2, 4, 8 Wochen wurden Cre<sup>-</sup>-Tiere (n= 4 pro Zeitpunkt) und Cre<sup>+</sup>-Tiere (n= 4 pro Zeitpunkt) 3 Tage mit TAM (3\*40 mg/kg) behandelt und entweder 8 Wochen später, 4 Wochen, 2 Wochen, 1 Woche oder am Tag der letzten Injektion am Tag 0 geschallt. Für den Zeitpunkt 11 Wochen wurden Cre<sup>-</sup>-Tiere (n= 18) und Cre<sup>+</sup>-Tiere (n= 17) mit TAM (3\*40 mg/kg) behandelt und 11 Wochen später geschallt. Die EF (A), die FS (B), das LVEDV (C), das LVESV (D), das Schlagvolumen (E), und das Körpergewicht (F) wurden für jedes Tier bestimmt und ausgewertet. Außerdem wurde in (G) der Quotient aus linksventrikulärer Masse und Körpergewicht aufgetragen. Die orange markierten Kreise in den Graphen zeigen die Daten der Kontrolltiere (Cre<sup>-</sup>), die grün markierten Kreise die Daten der Versuchsgruppe (Cre<sup>+</sup>) von Zeitpunkt 0, 1, 2, 4 und 8 Wochen. Zur Abgrenzung beider Versuche wurden für den Zeitpunkt 11 Wochen dreieckige statt runder Symbole im selben Farbcode verwendet. Statistische Signifikanzen gegenüber der Kontrollgruppe (Cre<sup>-</sup>) wurden zu jedem Zeitpunkt mittels Mann Whitney Test bestimmt (\*\*\* p<0,001; \*\* p<0,01; \* p<0,05). Statistische Signifikanzen innerhalb einer Gruppe (Cre<sup>-</sup>/Cre<sup>+</sup>) gegenüber dem jeweiligen Zeitpunkt 0 wurden ebenfalls mittels Mann Whitney Test errechnet (\*\*\* p<0,001; \*\* p<0,01; \* p<0,05) [gilt nur für die Zeitpunkte 0, 1, 2, 4 und 8 Wochen]. Die Standardabweichungen sind im Anhang (Tabelle 6.5) dargestellt

### 3.3.3 Signifikante Expressionssteigerung von Genen, involviert in der Herzinsuffizienz

Nach einer klaren Evidenz, dass Tiere durch die Deletion der Top2b eine dilatative Kardiomyopathie entwickelt haben, sollten in Anlehnung an eine Veröffentlichung von Schips et al. (Schips *et al.*, 2011a) die mRNA-Expressionsänderung zweier wichtiger Gene: atriales natriuretisches Peptid (ANP) und natriuretisches Peptid Typ B (BNP), deren Expressionen bei einer vorliegenden Herzschädigung hochreguliert sind (Mosterd and Hoes, 2007; Angermann and Ertl, 2004), bestimmt werden.

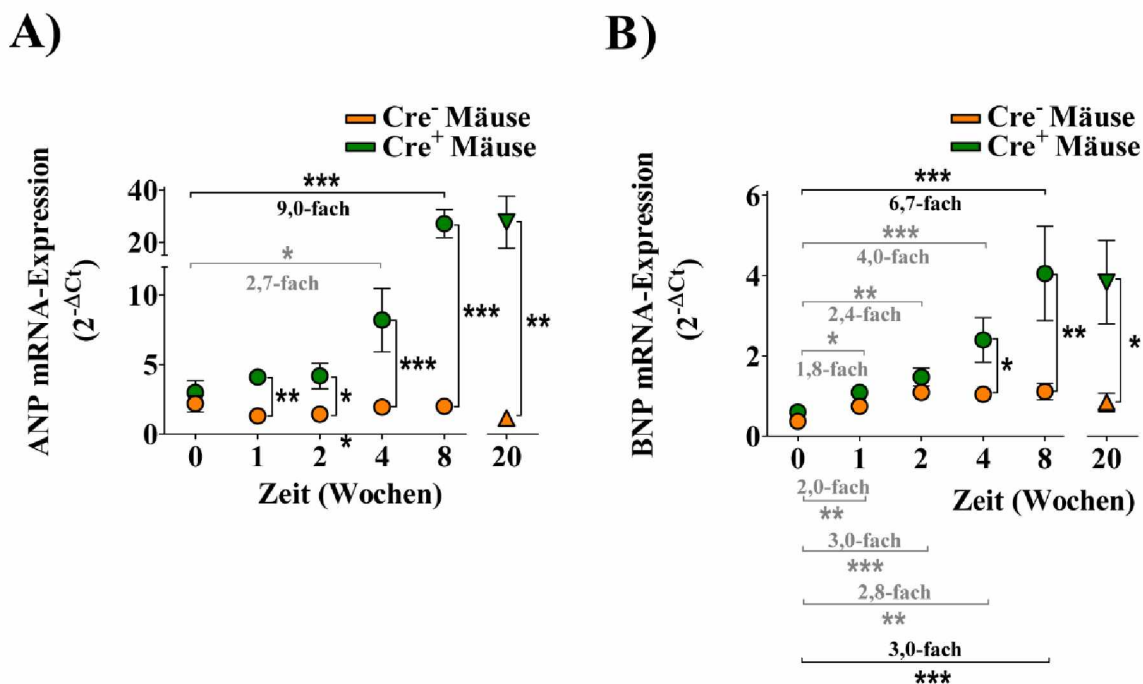
Nach der echokardialen Untersuchung wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet, das Herz entnommen und RNA isoliert. Durch eine Wiederholung des Zeitverlaufsexperiments (ohne echokardiale Funktionsanalyse) konnte für diese Analyse die doppelte Anzahl an Tieren pro Zeitpunkt eingeschlossen werden. Daraus folgt, dass für den Zeitpunkt 0 jeweils 8 Cre<sup>-</sup>- und Cre<sup>+</sup>-Tiere verwendet wurden, für Zeitpunkt 1 7 Tiere pro Gruppe, für Zeitpunkt 2 und 4 jeweils 8 Tiere pro Gruppe und für Zeitpunkt 8 7 Tiere für Cre<sup>-</sup> und 8 Tiere für Cre<sup>+</sup>. Die 7 Cre<sup>-</sup>- und 4 Cre<sup>+</sup>-Tiere von Zeitpunkt 20 resultierten aus den MRT-Untersuchungen. Dort wurden die Tiere nach der 3. MRT-Messung zum Zeitpunkt 16 Wochen nochmals 4 Wochen beobachtet, bevor sie ebenfalls durch zervikale Dislokation getötet wurden und RNA isoliert wurde. Zur Unterscheidung wurden für die Tiere zum Zeitpunkt 20 in Abbildung 3.14 dreieckige Symbole verwendet.

Abbildung 3.14 A zeigt, dass sich die Expression von ANP in den nichtdeletierten Kontrolltieren über den Zeitverlauf von 8 Wochen nicht verändert hat. In den Top2b-deletierten Tieren konnte eine progressive Steigung der ANP-Expression von Zeitpunkt 0 bis 8 Wochen verzeichnet werden, obwohl signifikante Unterschiede gegenüber dem Zeitpunkt 0 erst nach 4 und 8 Wochen detektierbar waren. Hierbei ist festzuhalten, dass zum Zeitpunkt 4 eine 2,7-fache Expressionssteigerung von ANP vorlag, die bis zum

Zeitpunkt 8 sogar auf eine verneunfachte Expression anstieg. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass zu den Zeitpunkten 1, 2, 4, 8 und 20, eine signifikante Erhöhung der ANP-Expression in den deletierten Tieren im Vergleich zu den nichtdeletierten Tieren erkennbar war.

Abbildung 3.14 B zeigt, dass die Expression von BNP sowohl in den Kontrolltieren als auch in den Top2b-deletierten Tieren nach 1, 2, 4 und 8 Wochen gestiegen ist (verglichen mit dem jeweiligen 0 Wert). Für die Top2b-deletierten Tiere ist eine progressive Steigerung der BNP-Expression über den Zeitverlauf sichtbar, die zum Zeitpunkt 4 4,0-fach und zum Zeitpunkt 8 sogar 6,7-fach im Vergleich zum Zeitpunkt 0 erhöht war. Gleichzeitig konnten signifikante BNP-Expressionssteigerungen in den deletierten Tieren versus den nichtdeletierten Tiere zu den Zeitpunkten 4, 8 und 20 Wochen festgestellt werden.

Trotz der Expressionssteigerungen in den Kontrolltieren, die zu den Zeitpunkten 1 und 2 Wochen mit denen in den deletierten Tieren vergleichbar waren, konnte insgesamt eine deutlichere Zunahme der BNP-Expression in den Top2b-deletierten Tieren gezeigt werden.



**Abbildung 3.14 Genexpressionsveränderungen von ANP und BNP in Top2b-deletierten Tieren und nichtdeletierten Kontrolltieren**

Die mRNA-Expressionsänderungen von ANP und BNP wurden für die Zeitpunkte 0 (Cre<sup>-</sup>/Cre<sup>+</sup>: n= 8), Zeitpunkt 1 (Cre<sup>-</sup>/Cre<sup>+</sup>: n= 7), Zeitpunkt 2 (Cre<sup>-</sup>/Cre<sup>+</sup>: n= 8), Zeitpunkt 4 (Cre<sup>-</sup>/Cre<sup>+</sup>: n= 8), Zeitpunkt 8 (Cre<sup>-</sup>: n= 7, Cre<sup>+</sup>: n= 8) und Zeitpunkt 20 (Cre<sup>-</sup>: n= 7, Cre<sup>+</sup>: n= 4) bestimmt. Die Expressionen wurden mittels qPCR und  $\Delta Ct$ -Methode quantifiziert und auf die 18srRNA normalisiert. Die y-Achse stellt die  $2^{-\Delta Ct}$  Werte dar (Mittelwert mit Standardfehler).

Der Zeitverlaufsversuch (Zeitpunkt 1 - 8) wurde von dem letzten Zeitpunkt 20 Wochen durch die Verwendung unterschiedlicher Symbole bei gleichbleibender Farbwahl graphisch getrennt. Statistische Signifikanzen gegenüber der Kontrollgruppe (Cre<sup>-</sup>) wurden zu jedem Zeitpunkt mit einem Mann Whitney Test ermittelt (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ). Statistische Signifikanzen innerhalb einer Gruppe (Cre<sup>-</sup>/Cre<sup>+</sup>) gegenüber dem jeweiligen Zeitpunkt 0 wurden ebenfalls mit einem Mann Whitney Test ermittelt (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ) [gilt nur für die Zeitpunkte 0, 1, 2, 4 und 8 Wochen]. Für die Darstellung der ANP- und BNP-Expressionsänderungen innerhalb einer Gruppe wurden die  $2^{-\Delta C_t}$  Werte der Cre<sup>-</sup>- und Cre<sup>+</sup>-Tiere zum Zeitpunkt 0 auf 1 gesetzt und die Expressionsänderungen zu den Zeitpunkten 1, 2, 4 und 8 relativ dazu bestimmt (Angabe in „x fach“ im Graph). Die Standardabweichungen sind im Anhang (Tabelle 6.6) dargestellt.

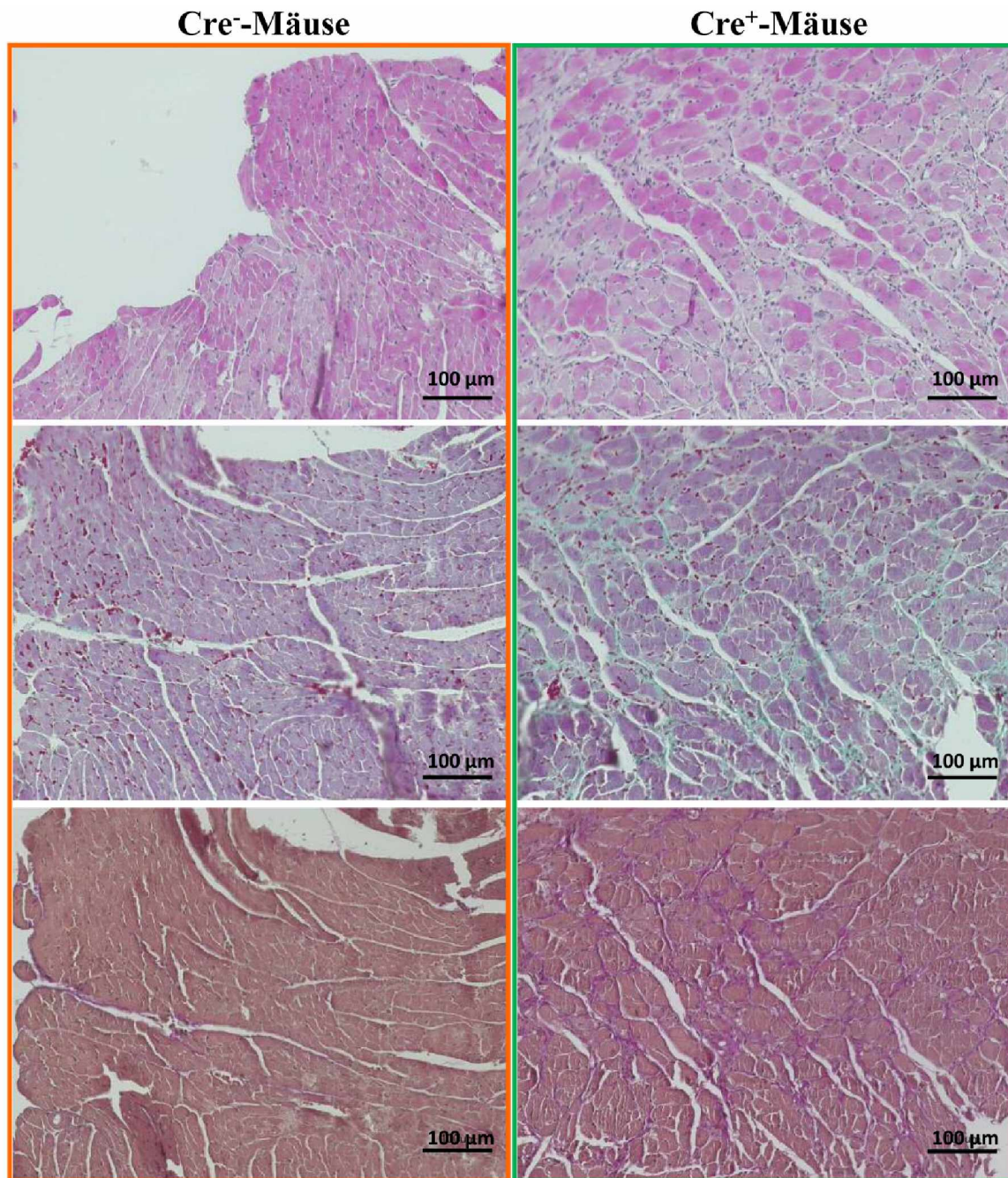
### 3.4 Deutliche fibrotische Akkumulationen im Herzgewebe nach Top2b-Deletion

Nach den funktionellen Echo- und MRT-Untersuchungen wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, die Herzen entnommen und von jedem Zeitpunkt histologische Paraffinschnitte mit anschließender H&E-, Masson-Goldner- und Elastika-van-Gieson-Färbung angefertigt.

Aufgrund der Evidenz einer entstandenen dilatativen Kardiomyopathie in den Top2b-deletierten Tieren sollten auch auf histologischer Ebene Anzeichen einer entstandenen Kardiomyopathie, z. B. die Zunahme von kollagenem Bindegewebe (Yoshikane *et al.*, 1992) untersucht werden.

Abbildung 3.15 zeigt repräsentative histologische Bilder von nichtdeletierten Kontrolltieren im Vergleich zu Top2b-deletierten Tieren 8 Wochen nach der Implementierung des Top2b-Knockouts. Die linke Spalte zeigt Schnitte von Cre<sup>-</sup>-Tieren, die rechte Spalte Bilder von Cre<sup>+</sup>-Tieren. In den H&E-Bildern ist bereits zu erkennen, dass die geordnete Aneinanderlagerung der Kardiomyozyten wie sie in den Cre<sup>-</sup>-Tieren zu sehen ist, in dem Schnitt der deletierten Maus nicht gegeben ist. Hier sind die einzelnen Kardiomyozyten umrundet von vermehrt vorkommendem interstitiellem Bindegewebe. Anzeichen für das Vorliegen hypertropher Zellen finden sich nicht.

Die Masson-Goldner-Färbung färbt kollagene Bereiche mit Lichtgrün an (Xiong *et al.*, 2007). Die in der H&E-Färbung bereits entdeckte Akkumulation des interstitiellen Bindegewebes in den Top2b-deletierten Tiere konnte in der MG-Färbung verifiziert werden (Abbildung 3.15 mittlere Bilder). Eine vergleichbar starke Zunahme von kollagenem Bindegewebe konnte in den nichtdeletierten Kontrolltieren nicht gezeigt werden. Eine weitere Bindegewebsfärbung, die elastische und kollagene Fasern sichtbar macht ist die Elastika-van-Gieson-Färbung (Iwasaki *et al.*, 2008). Auch in dieser Färbung waren deutliche Zunahmen von interstitiellem Bindegewebe in Top2b-deletierten Tieren 8 Wochen nach der Induktion der Deletion zu sehen.



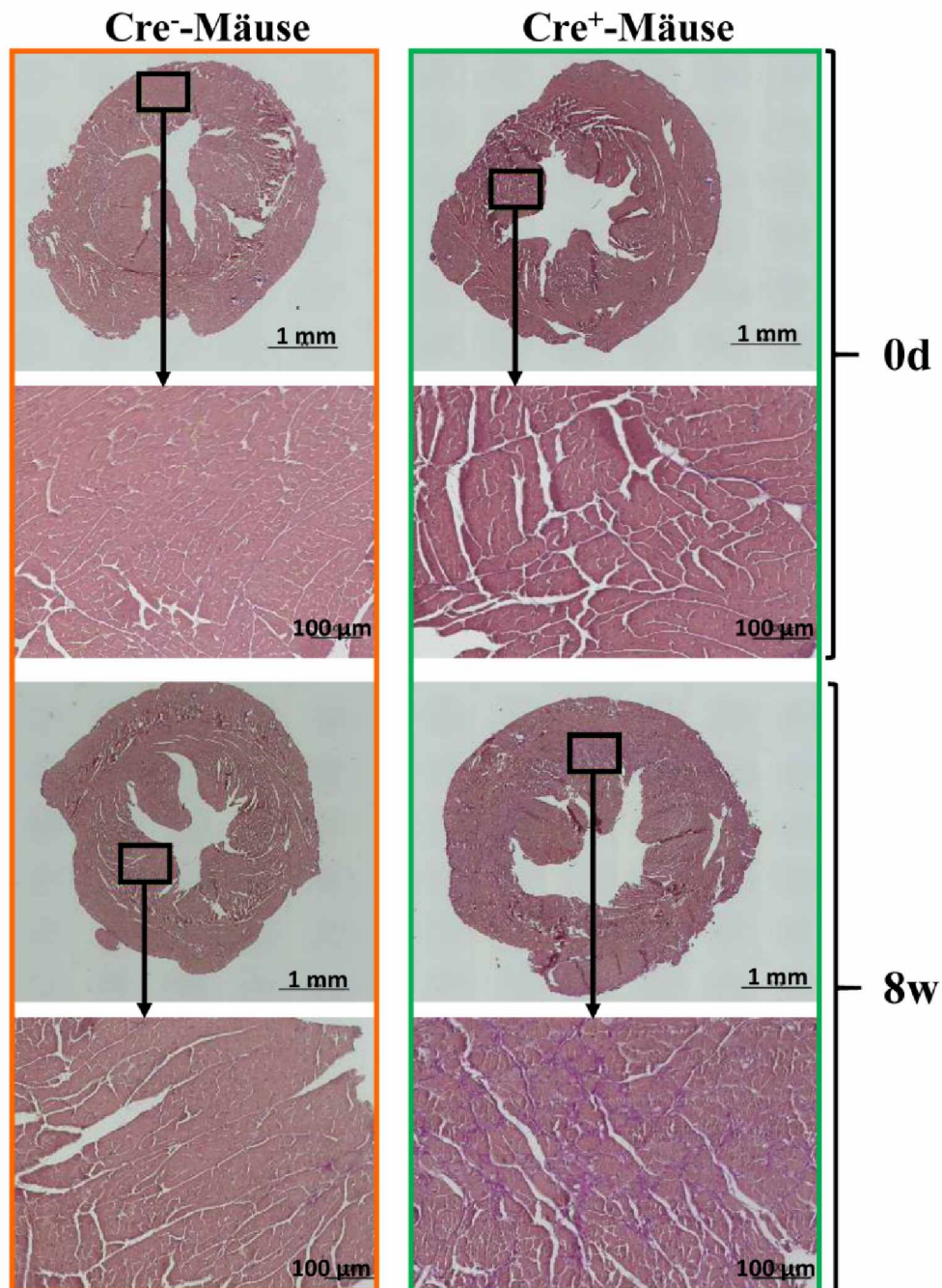
**Abbildung 3.15 Repräsentative histologische Bilder der interstitiellen Fibrose (von Top2 deletierten Tieren) dargestellt in H&E-, Masson-Goldner- und Elastika-van-Gieson Färbungen**

Schnitte von Cre<sup>-</sup>- und Cre<sup>+</sup>-Tieren wurden mit H&E, MG und EVG gefärbt und die Schnitte mit einem BZ-9000 Mikroskop (Keyence) in der 20<sup>x</sup> Vergrößerung fotografiert. Die Skalierungsachse definiert eine Länge von 100 µm. Die orange umrandeten Bilder zeigen Schnitte von nichtdeletierten Kontrolltieren, die grün umrandeten Bilder zeigen die Schnitte von Top2b-deletierten Tieren 8 Wochen nach Implementierung des Knockouts (3\* 40 mg/kg TAM). Die oberen 2 Bilder zeigen H&E-Färbungen, die mittleren die Masson-Goldner-Färbung (interstitielle Fibrose in den Cre<sup>+</sup>-Tieren ist grünlich gefärbt) und die unteren Bilder zeigen die Elastika-van-Gieson-Färbung (interstitielle Fibrose in den Cre<sup>+</sup>-Tieren ist rosa gefärbt).

In Abbildung 3.16 sind nochmals die EVG-gefärbten Schnitte von Cre<sup>-</sup>-Tieren denen der Cre<sup>+</sup>-Mäusen zu den Zeitpunkten 0 und 8 Wochen gegenübergestellt. Zum Zeitpunkt 0



konnten keine Unterschiede in den EVG-Schnitten der nichtdeletierten und Top2b-deletierten Tiere festgestellt werden. Die größeren Lücken in dem EVG-Bild der Cre<sup>-</sup>-Maus sind nicht herauszuheben, da diese lediglich Artefakte, die beim Schneiden des Schnittes entstanden sind, darstellen. Die zum Zeitpunkt 8 Wochen entstandenen fibrotischen Zunahmen in den Top2b-deletierten Tieren wurden bereits beschrieben.



**Abbildung 3.16 Repräsentative EVG-gefärbte Bilder der interstitiellen fibrotischen Progression zu den Zeitpunkten 0 und 8 Wochen**

Schnitte von Cre<sup>-</sup>- und Cre<sup>+</sup>-Tieren wurden mit der Elastika-van-Gieson Methode gefärbt und die Schnitte mit einem BZ-9000 Mikroskop (Keyence) in der 10\* Vergrößerung (Übersichtsbild, Skalierungsachse: 1 mm) und in der 20\* Vergrößerung (Skalierungsachse: 100 µm) fotografiert. Die orange umrandeten Bilder zeigen Schnitte von nichtdeletierten Kontrolltieren, die grün umrandeten Bilder zeigen die Schnitte von Top2b-deletierten Tieren 0 und 8 Wochen nach

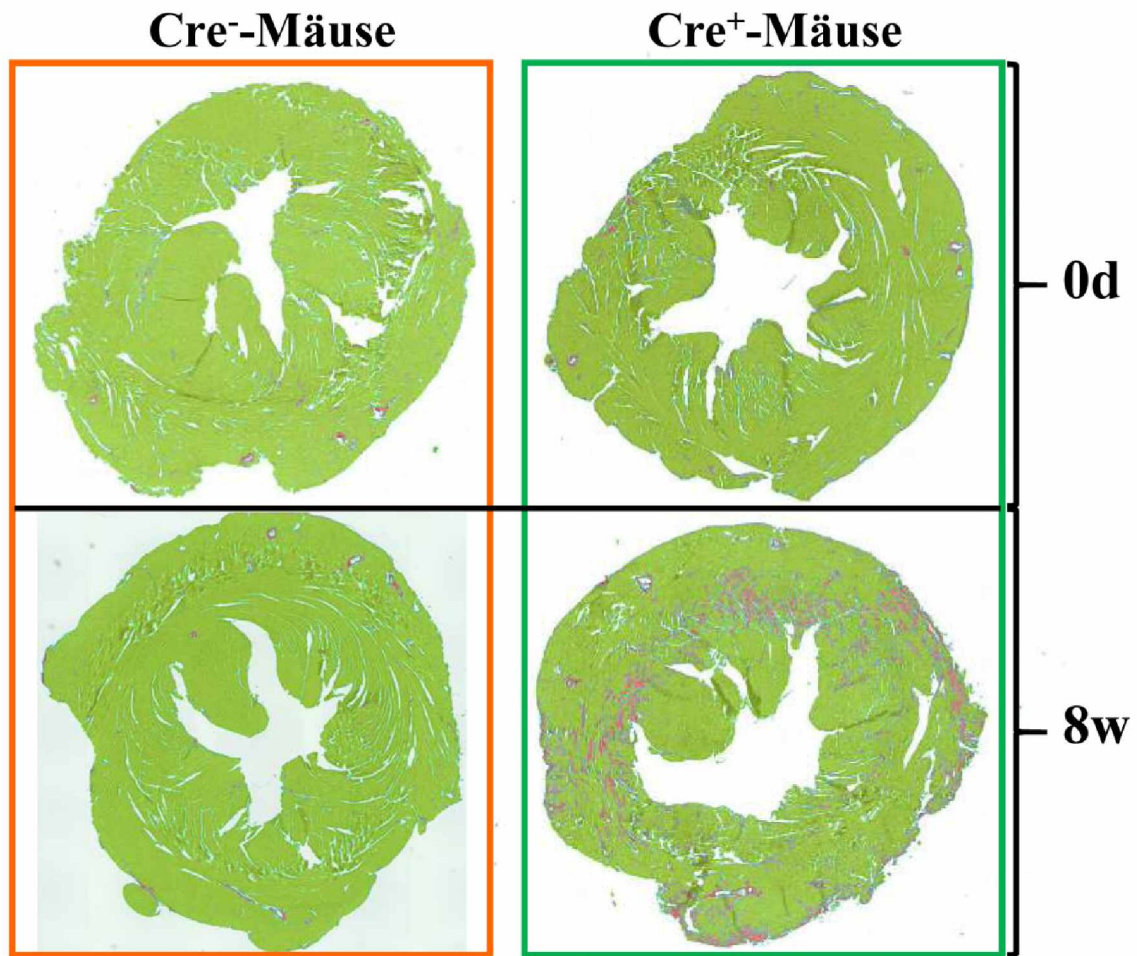
Implementierung des Knockouts (3\* 40 mg/kg TAM). Interstitielle fibrotische Areale sind rosa gefärbt.

### **3.4.1 Sechsfache Steigerung des Bindegewebes in Top2b-deletierten Tieren 8 Wochen nach der Implementierung des Knockouts**

Da eine reine visuelle Begutachtung der Schnitte zur Detektion möglicher zeitlich bedingter fibrotischer Unterschiede nicht ausreichend erschien, wurde die Fibrose mittels der BZ-II Analyzer Software (Keyence) zu allen Zeitpunkten quantifiziert.

Die Idee bestand in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Christoph Brochhausen und Dr. Volker Schmitt zunächst darin, unter der Verwendung von sogenannten „Bändern“, die die fibrotischen Areale im Schnitt darstellen, eine quantitative Aussage in Bezug auf das ganze Bild treffen zu können. Die in der Literatur verwendeten semiquantitativen Fibrose-Scores, die auf individuellen Untersuchungen beruhen, variieren zwischen einer Skala von 0 - 3+, 0 - 3 und 0 - 4, wobei 0 keine pathologischen fibrotischen Veränderungen darstellt und 3+, 3 und 4 die jeweils schwerwiegendste fibrotische Modifikation (Falk *et al.*, 2010; Mall *et al.*, 1990; van Hoesen and Factor, 1990). Da die Fibrose jedoch nicht in Form von „Bändern“ angelagert war, sondern vielmehr diffus und verstreut über den gesamten histologischen Schnitt verteilt vorlag, war sowohl eine Quantifizierung der „Bänder“, als auch bereits etablierte Fibrose-Scores aus der Literatur zur semiquantitativen Auswertung nicht geeignet. In der BZ-II Analyzer Software von Keyence fand sich daher die beste Möglichkeit einer semiquantitativen Auswertung.

Abbildung 3.17 zeigt das zugrundeliegende Prinzip der Auswertung. Das Programm markiert und berechnet die Fläche des kompletten Schnittes (grüner Bereich) und bezieht die Fläche der fibrotischen Bereiche (dargestellt in roter Farbe) anteilhaft darauf. In die semiquantitative Auswertung wurden sowohl interstitiell als auch perivaskulär vorkommende Bindegewebsbereiche eingeschlossen.



**Abbildung 3.17 Darstellung zur Quantifizierung fibrotischer Areale in *Top2b*-deletierten Tieren zu den Zeitpunkten 0 und 8 Wochen**

Schnitte von  $Cre^-$ - und  $Cre^+$ -Tieren wurden mit der Elastika-van-Gieson Methoden gefärbt, die Schnitte mit einem BZ-9000 Mikroskop (Keyence) fotografiert und fibrotische Areale mittels des Analyseprogramms BZ-II Analyzer (Keyence) quantifiziert. Die orange umrandeten Bilder zeigen Schnitte von nichtdeletierten Kontrolltieren, die grün umrandeten Bilder zeigen die Schnitte von *Top2b*-deletierten Tieren 0 und 8 Wochen nach Implementierung des Knockouts ( $3 \times 40$  mg/kg TAM). Durch das Analyseprogramm wird die Fläche des gesamten Schnittes grünlich markiert und die interstitielle Fibrose (markiert in rot) relativ darauf bezogen. Rein visuell konnte 8 Wochen nach der *Top2b*-Deletion bereits eine Zunahme der roten Bereiche in den  $Cre^+$ -Tieren verzeichnet werden.

Das Quantifizierungsergebnis ist in Abbildung 3.18 dargestellt. Anhand des Kurvenverlaufes konnte keine Zunahme fibrotischer Bereiche in den Kontrolltieren (orange markiert) festgestellt werden. In den *Top2b*-deletierten Tieren war jedoch ein leichter prozentualer Anstieg der Fibrose sichtbar, der 8 Wochen später – entsprechend der ersten rein optischen Bewertung- sogar signifikant im Vergleich zum Zeitpunkt 0 war. Außerdem zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Kontrolltieren und deletierten Tieren 8 Wochen und 20 Wochen nach Induktion des Knockouts.

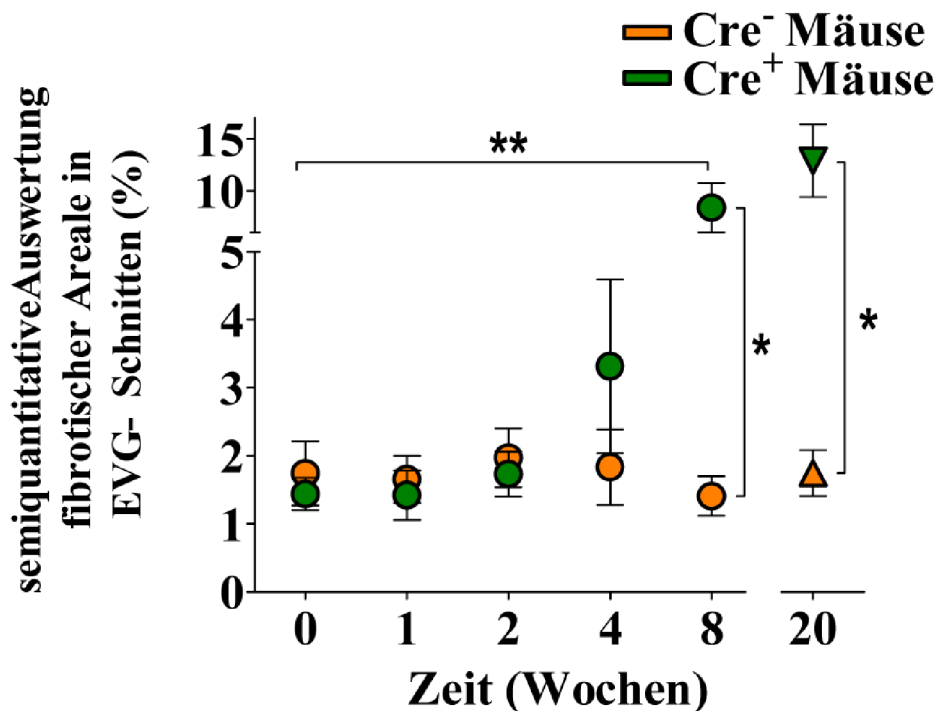


Abbildung 3.18 *Semiquantitative Auswertung fibrotischer Areale in EVG-gefärbten Schnitten von Top2b-deletierten Tieren im Vergleich zu nichtdeletierten Kontrolltieren*

Für die Zeitpunkte 0 (Cre<sup>-</sup>/Cre<sup>+</sup>: n= 8 Tiere), 1 (Cre<sup>-</sup> n= 7 Cre<sup>+</sup> n= 6), 2 und 4 (Cre<sup>-</sup> n= 8 Cre<sup>+</sup> n= 7) sowie 8 (Cre<sup>-</sup>/Cre<sup>+</sup>: n= 7) und 20 (Cre<sup>-</sup>: n= 5, Cre<sup>+</sup>: n= 4) wurden mit Elastika-van-Gieson gefärbte Schnitte mittels des Analyseprogramms BZ-Analyser (Keyence) quantifiziert. Durch das Analyseprogramm wird die Fläche des gesamten Schnittes markiert und die interstitielle Fibrose relativ darauf bezogen (Angaben in % auf der y-Achse). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardfehler. Statistische Signifikanzen gegenüber der Kontrollgruppe (Cre<sup>-</sup>) wurden zu jedem Zeitpunkt mit einem Mann Whitney Test ermittelt (\*\* p<0,01; \* p<0,05). Statistische Signifikanzen innerhalb einer Gruppe (Cre<sup>-</sup>/Cre<sup>+</sup>) gegenüber dem jeweiligen Zeitpunkt 0 wurden ebenfalls mit einem Mann Whitney Test ermittelt (\*\* p<0,01; \* p<0,05) [gilt nur für die Zeitpunkte 0, 1, 2, 4 und 8 Wochen]. Die Standardabweichungen sind im Anhang (Tabelle 6.7) dargestellt.

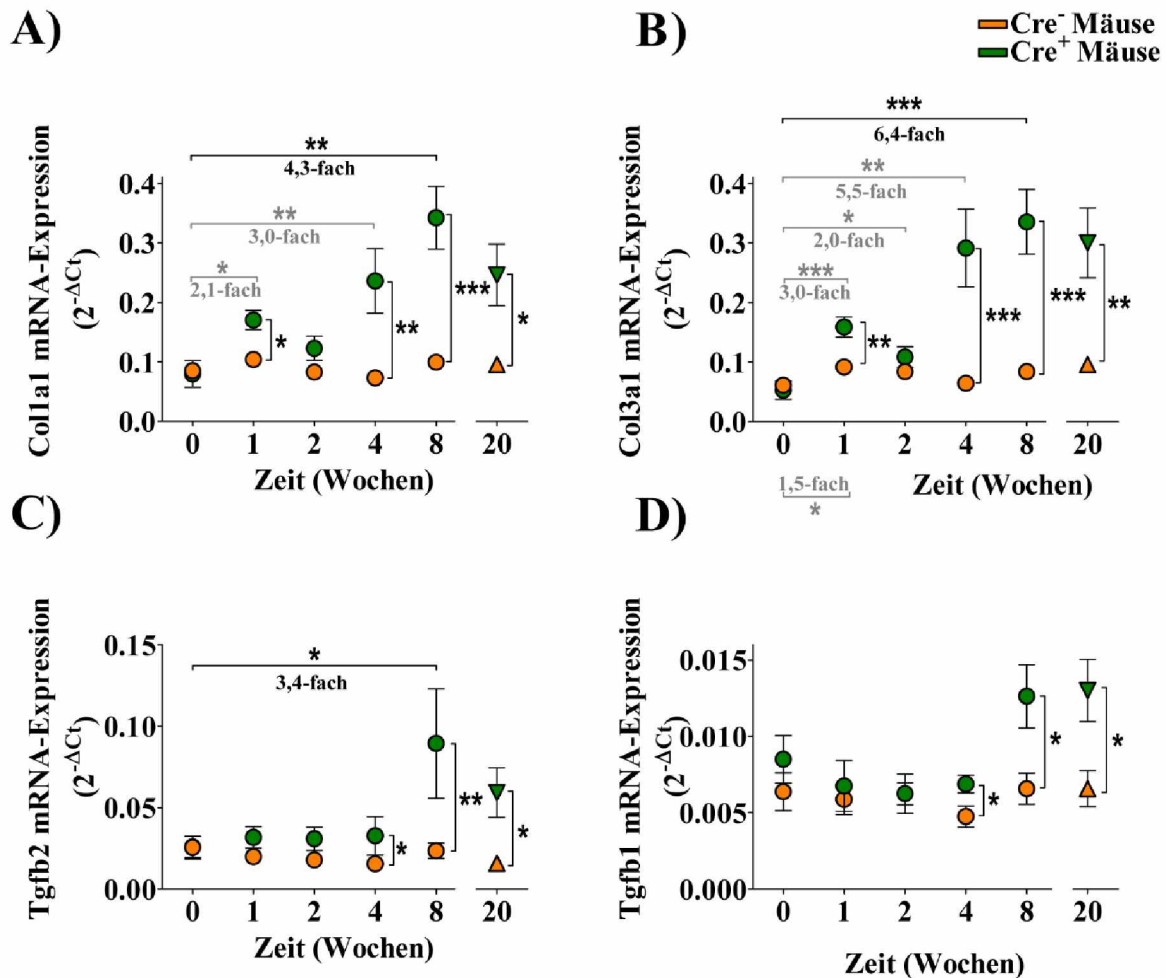
### 3.4.2 Verifizierung der vorhandenen kollagenen Ausbreitungen anhand quantitativer Expressionsanalysen

Die Typ I- und Typ III-Kollagene sind mit ca. 80% und 10% die am häufigsten vorkommenden Kollagentypen im Herzen (Brown *et al.*, 2005). TGFβ ist ein Wachstumsfaktor und hat drei Isoformen: Tgfβ1, 2 und 3, deren biologische Eigenschaften nahezu identisch sind (Border and Noble, 1994). Tgfβ ist an der Regulation von Zellproliferation und Apoptose beteiligt und induziert durch Ablagerung der ECM Fibrose (Border and Ruoslahti, 1992; Manabe *et al.*, 2002). Aus diesem Grund wurde die mRNA-Expressionsänderung der Col1a1, Col3a1, Tgfβ1 und Tgfβ2 Gene mittels quantitativer PCR in Ganzherzhomogenaten gemessen. Des Weiteren gehören drei dieser Gene zu den differentiell exprimierten Genen aus den RNA-seq Experimenten, die 2 Wochen nach der Deletion in Top2b-deletierten Tieren signifikant heraufreguliert waren (Col1a1: 5-fach, Col3a1: 6-fach, Tgfβ2: 3-fach) (siehe Abschnitt 3.6).

Abbildung 3.19 A zeigt die *Col1a1* mRNA-Expressionsänderung. Während des Zeitverlaufs konnten keine signifikanten Änderungen in den Kontrolltieren festgestellt werden. Demgegenüber konnte gezeigt werden, dass sich von Zeitpunkt 0 zu Zeitpunkt 1 die mRNA-Expression von *Col1a1* verdoppelt hat, nach 4 Wochen sogar verdreifacht; schließlich sogar vervierfacht zum Zeitpunkt 8 Wochen. Gleichzeitig konnten signifikante Unterschiede zwischen deletierten und nichtdeletierten Tieren nach 1, 4, 8 und 20 Wochen detektiert werden.

Abbildung 3.19 B zeigt die Genexpressionsänderung von *Col3a1*. Auch hier blieb die mRNA-Expression von *Col3a1* in den Kontrolltieren über den Zeitraum mehr oder weniger konstant, wobei die mRNA-Expression vom Zeitpunkt 0 zum Zeitpunkt 1 1,5-fach anstieg. Es konnte ein progressiver Anstieg der *Col3a1*-Menge in den *Top2b*-deletierten Tieren festgestellt werden. Unterschiede gegenüber dem Zeitpunkt 0 waren nach 1 (3-fach), 2 (2-fach), 4 (5,5-fach) und 8 (6,4-fach) Wochen zu verzeichnen. Gleichzeitig konnten signifikante Unterschiede zwischen deletierten und nichtdeletierten Tieren nach 1, 4, 8 und 20 Wochen detektiert werden.

Die Genexpressionen von *Tgfβ1* und *Tgfβ2* blieben zu den Zeitpunkten 0, 1 und 2 Wochen stabil. Ab dem Zeitpunkt 4 Wochen stellte sich in beiden Gruppen doch ein signifikanter Unterschied zwischen den *Top2*-deletierten Tieren und den Kontrolltieren ein. Eine 3,4-fache *Tgfβ2*-Expressionssteigerung war nach 8 Wochen zu verzeichnen. Darüber hinaus konnten für *Tgfβ1* und *Tgfβ2* auch signifikante Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe innerhalb der Zeitpunkte 8 und 20 Wochen detektiert werden.



**Abbildung 3.19 Genexpressionsveränderungen von Coll1a1, Col3a1, Tgfb2 und Tgfb1 in Top2b-deletierten Tieren und nichtdeletierten Kontrolltieren**

Die mRNA-Expressionsänderungen von Coll1a1 und Col3a1 wurden für die Zeitpunkte 0 (Cre<sup>-</sup>/Cre<sup>+</sup>: n= 8), 1 (Cre<sup>-</sup>: n= 7, Cre<sup>+</sup>: n= 8), 2 und 4 (Cre<sup>-</sup>/Cre<sup>+</sup>: n= 8), 8 (Cre<sup>-</sup>: n= 7, Cre<sup>+</sup>: n= 8) und 20 (Cre<sup>-</sup>: n= 7, Cre<sup>+</sup>: n= 4) bestimmt. Die mRNA-Expressionsänderungen von TGFβ2 wurden für die Zeitpunkte 0 (Cre<sup>-</sup>/Cre<sup>+</sup>: n= 8), 1 (Cre<sup>-</sup>/Cre<sup>+</sup>: n= 7), 2 (Cre<sup>-</sup>/Cre<sup>+</sup>: n= 8) und 4 (Cre<sup>-</sup>/Cre<sup>+</sup>: n= 7), 8 (Cre<sup>-</sup>: n= 6, Cre<sup>+</sup>: n= 8) und 20 (Cre<sup>-</sup>: n= 7, Cre<sup>+</sup>: n= 4) bestimmt. Die mRNA-Expressionsänderungen von TGFβ1 wurden für die Zeitpunkte 0, 1, 2, 4 (Cre<sup>-</sup>/Cre<sup>+</sup>: n= 8), 8 (Cre<sup>-</sup>: n= 7, Cre<sup>+</sup>: n= 8) und 20 (Cre<sup>-</sup>: n= 7, Cre<sup>+</sup>: n= 4) bestimmt. Die Expressionen wurden mittels qPCR und  $\Delta Ct$ -Methode quantifiziert und auf die 18srRNA normalisiert. Die y-Achse stellt die  $2^{-\Delta Ct}$  Werte dar (Mittelwert mit Standardfehler). Der Zeitverlaufsversuch (Zeitpunkt 1 - 8) wurde von dem letzten Zeitpunkt 20 Wochen durch die Verwendung unterschiedlicher Symbole bei gleichbleibender Farbwahl graphisch getrennt. Statistische Signifikanzen gegenüber der Kontrollgruppe (Cre<sup>-</sup>) wurden zu jedem Zeitpunkt mit einem Mann Whitney Test ermittelt (\*\*\*) p<0,001; \*\* p<0,01; \* p<0,05). Statistische Signifikanzen innerhalb einer Gruppe (Cre<sup>-</sup>/Cre<sup>+</sup>) gegenüber dem jeweiligen Zeitpunkt 0 wurden ebenfalls mit einem Mann Whitney Test ermittelt (\*\*\*) p<0,001; \*\* p<0,01; \* p<0,05) [gilt nur für die Zeitpunkte 0, 1, 2, 4 und 8 Wochen]. Für die Darstellung der Coll1a1, Col3a1 und TGFβ2 Expressionsänderungen innerhalb einer Gruppe wurden die  $2^{-\Delta Ct}$  Werte der Cre<sup>-</sup>-und Cre<sup>+</sup>-Tiere zum Zeitpunkt 0 auf 1 gesetzt und die Expressionsänderungen zu den Zeitpunkten 1, 2, 4 und 8 relativ dazu bestimmt (Angabe in „x-fach“ im Graph). Die Standardabweichungen sind im Anhang (Tabelle 6.8) dargestellt.

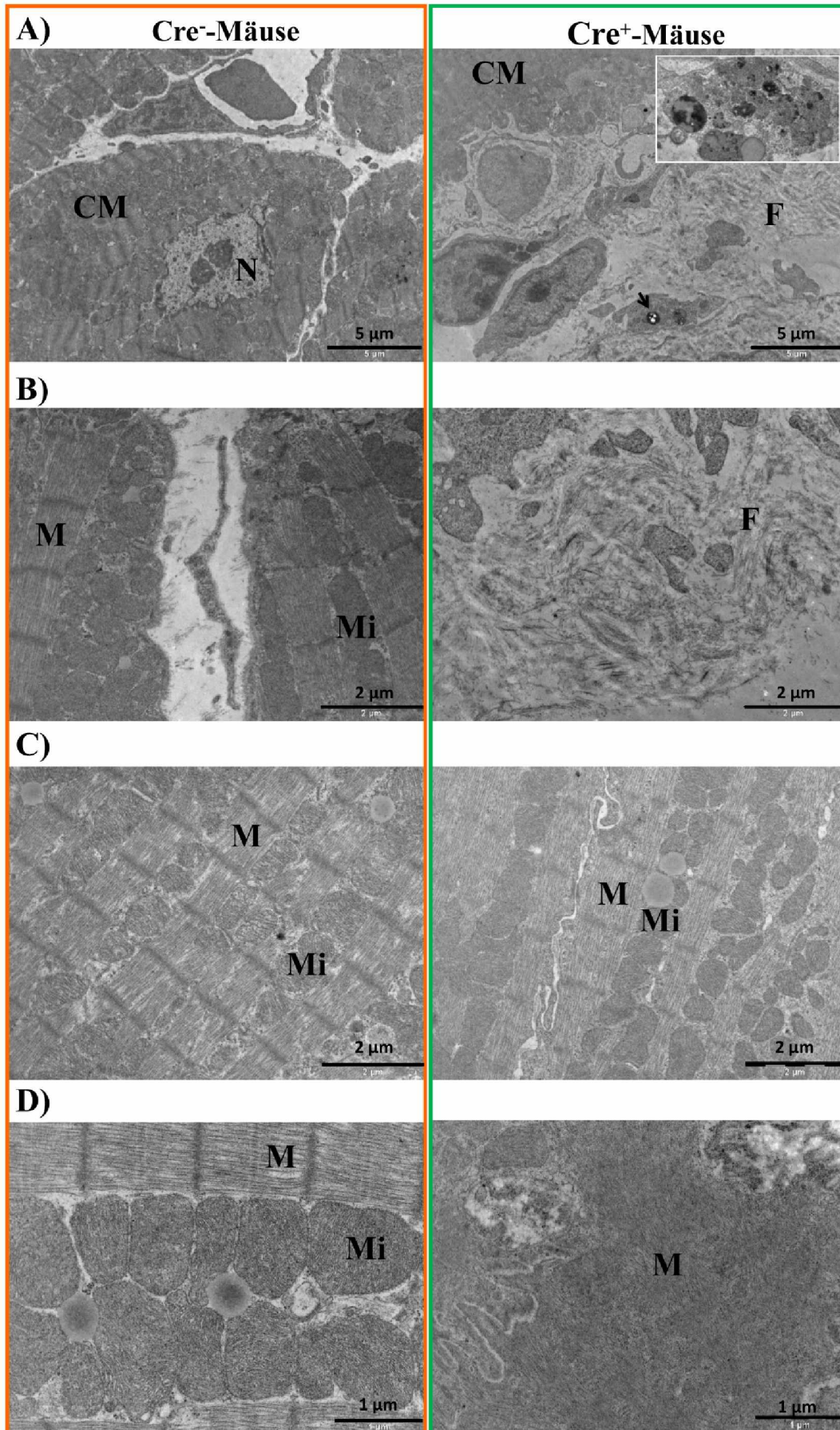
### 3.4.3 Fibrotische Ansammlungen in Top2b-deletierten Tieren (Elektronenmikroskopie)

Neben den klassischen histologischen Färbungen sollten auch strukturelle Veränderungen auf Ebene einzelner Zellen zwischen Top2b-deletierten und nichtdeletierten Tieren begutachtet werden. Dafür wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

Abbildung 3.20 zeigt elektronenmikroskopische Bilder von Cre<sup>-</sup>-Mäusen (orange umrandet) und Cre<sup>+</sup>-Tieren (grün umrandet) 8 Wochen nach Gabe von TAM (3\*40 mg/kg). In Abbildung 3.20 A ist zunächst eine Übersicht des Gewebes gegeben. Die strukturelle Anordnung der Kardiomyozyten (CM) mit inliegendem Kern (N) in Cre<sup>-</sup>-Mäusen wird in Cre<sup>+</sup>-Tieren durch spindelförmige kollagene Bindegewebestrukturen (F) unterbrochen. Die durch den Pfeil markierte Struktur könnte einen eingewanderten Makrophagen darstellen. Das kleine Bild in der Ecke stellt eine Vergrößerung einer weiteren Aufnahme dar, die zu Grunde gegangene Zellen demonstriert, die durch Makrophagen phagozytiert werden.

Abbildung 3.20 B des Kontrolltiers zeigt das Interstitium und umliegende Kardiomyozyten (mit längsgestreifter Muskulatur (M)). In dieser Vergrößerung sind Mitochondrien (Mi) sichtbar. Im Bild der Top2b-deletierten Maus sind die Strukturen verworren und die Ansammlung der kollagenen Fasern noch stärker herausgehoben.

Abbildung 3.20 C und D zeigt die muskuläre und mitochondriale Struktur in den Kardiomyozyten. Die längsgestreiften Muskelbündel (M) sind neben den Mitochondrien (Mi) angeordnet. Mitochondriale Dysfunktionen konnten nicht festgestellt werden. In einigen Regionen konnten 8 Wochen nach TAM-Gabe keine Veränderungen und Störungen in der Sarkomer-Struktur in den Top2b-deletierten Tieren gesehen werden (C). An anderen Stellen jedoch war das Sarkomer völlig zerstört (D).





### **Abbildung 3.20 Elektronenmikroskopische Untersuchungen in Top2b-deletierten und nichtdeletierten Kontrolltieren 8 Wochen nach Knockout-Induktion**

Ultradünnschnitte von Cre<sup>-</sup>- und Cre<sup>+</sup>-Tieren wurden nach Fixierung und Aufarbeitung elektronenmikroskopisch mittels eines Transmissionselektronenmikroskops begutachtet. Die orange umrandeten Bilder zeigen Schnitte von nichtdeletierten Kontrolltieren, die grün umrandeten Bilder zeigen die Schnitte von Top2b-deletierten Tieren 8 Wochen nach Implementierung des Knockouts (3\* 40 mg/kg TAM). (A) zeigt Bilder in einer Vergrößerung von 4200. Skalierungsachse: 5 µm. (B und C) zeigen Bilder der Vergrößerung 11.500. Skalierungsachse 2 µm. (D) zeigt Bilder in der 20.500-fachen Vergrößerung. Skalierungsachse 1 µm. CM: Kardiomyozyt, N: Nukleus, F: Fibrose, M: Muskel, Mi: Mitochondrien.

## **3.5 Manifestierte Kardiomyopathie: nur ein Cre-Effekt?**

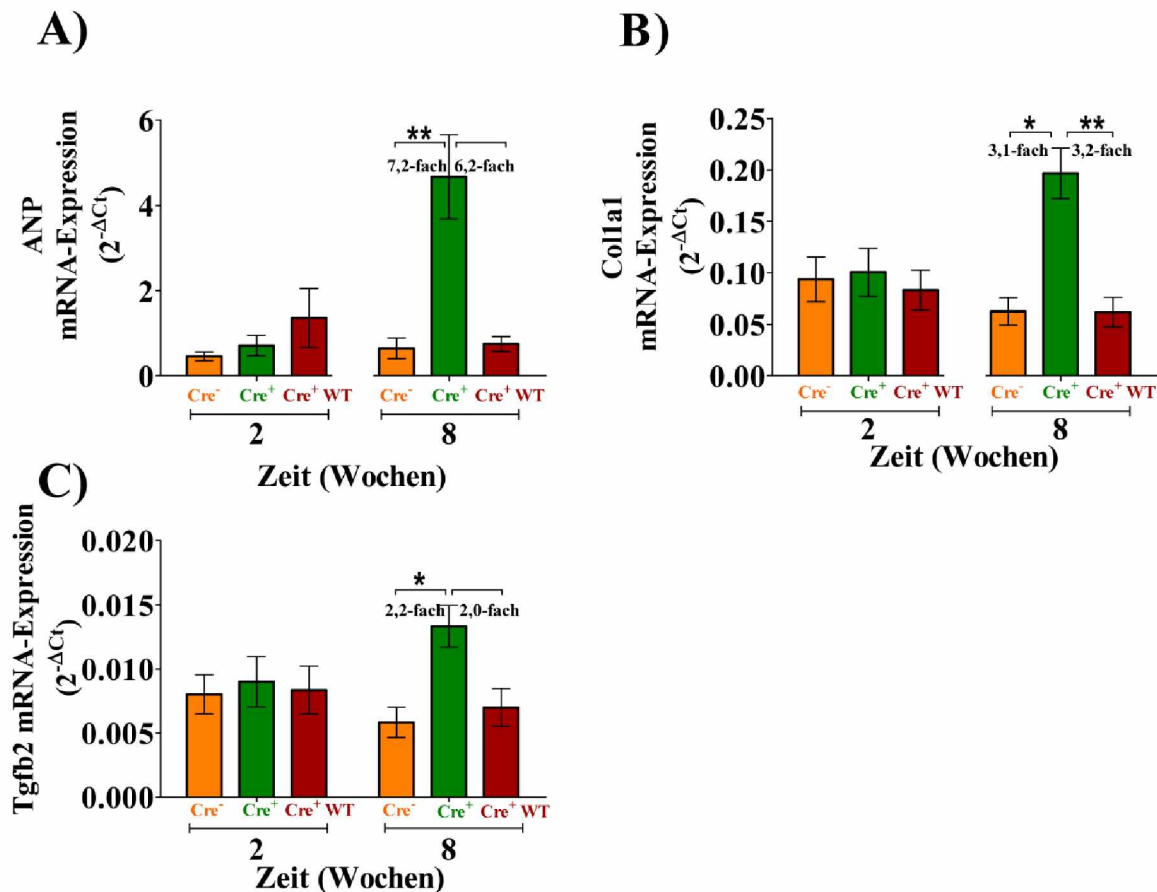
In einer weiteren Versuchsreihe sollte gezeigt werden, dass die funktionell und histologisch erfasste Verschlechterung der Top2b-deletierten Tiere auf die Deletion der Top2b und nicht auf einen Cre-Rekombinase-Effekt zurückzuführen ist.

Es wurde ein neues Zeitverlaufsexperiment gestartet, in welchem Tiere (3 Gruppen à 6 Tiere/Zeitpunkt: Cre<sup>-</sup>, Cre<sup>+</sup> und Cre<sup>+</sup> WT) mit TAM (3\*40 mg/kg/Tag) behandelt wurden. Cre+WT-Tiere tragen beide Top2b-WT-Allele und keine LoxP-Seiten. Eine TAM-induzierte Top2b-Deletion ist daher nicht möglich.

2 und 8 Wochen nach der letzten TAM-Injektion wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet, das Herz entnommen und RNA isoliert. Abbildung 3.21 zeigt die Genexpressionsveränderungen von ANP, Colla1 und Tgfb2 für die beiden Zeitpunkte 2 und 8 Wochen.

2 Wochen nach TAM-Gabe konnten keine signifikanten Genexpressionsunterschiede zwischen den drei Gruppen festgestellt werden. In Anlehnung an die bereits beschriebenen Ergebnisse konnte wiederum gezeigt werden, dass 8 Wochen später die Expression von ANP in den Top2b-deletierten Tieren signifikant (7,2-fach) gestiegen war im Vergleich zu den nichtdeletierten Tieren. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Expressionssteigerung von ANP der Top2b-deletierten Tiere 6,2-fach gestiegen war im Vergleich zu den Cre-Rekombinase-tragenden Kontrolltieren. Im Vergleich Top2b-nichtdeletierte Tiere (Cre<sup>-</sup>) versus Cre-Rekombinase-tragende Kontrolltiere (Cre<sup>+</sup> WT) konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, so dass von einem Cre-Rekombinase-unabhängigen Effekt ausgegangen werden kann.

Ein vergleichbares Bild zeigt sich in Abbildung 3.21 B und C. Auch hier waren signifikante, 2- bis 3-fache Anstiege der Genexpression von Colla1 und Tgfb2 in Cre<sup>+</sup>-Tieren im Vergleich zu Cre<sup>-</sup>- und Cre<sup>+</sup> WT-Tieren erkennbar.



**Abbildung 3.21 Genexpressionsveränderungen von ANP, Col1a1 und Tgfb2 in Cre<sup>-</sup>- und Cre<sup>+</sup>-Tieren im Vergleich zu Cre-Rekombinase-tragenden Kontrolltieren**

Die mRNA-Expressionsänderungen von ANP (A), Col1a1 (B) und Tgfb2 (C) wurden für die Zeitpunkte 2 Wochen (Cre<sup>-</sup>/Cre<sup>+</sup>/Cre<sup>+</sup> WT: n= 6) und Zeitpunkt 8 Wochen (Cre<sup>-</sup>/Cre<sup>+</sup>: n= 6 Cre<sup>+</sup>WT: n= 7) bestimmt. Die Expressionen wurden mittels qPCR und  $\Delta Ct$ -Methode quantifiziert und auf die 18srRNA normalisiert. Die y-Achse stellt die  $2^{-\Delta Ct}$  Werte dar (Mittelwert mit Standardfehler). Statistische Signifikanzen innerhalb eines Zeitpunktes wurden mit einem Kruskal-Wallis-Test ermittelt (\*\* p<0,01; \* p<0,05). Die Standardabweichungen sind im Anhang (Tabelle 6.9) dargestellt.

### 3.6 Der genomweite Umfang der differentiell exprimierten Gene nach einer Top2b-Deletion

Nachdem funktionelle Verschlechterungen sowie fibrotische Veränderungen in den Top2b-deletierten Tieren nachgewiesen werden konnten, sollte mittels einer Hochdurchsatz-Sequenzierung das vollständige Ausmaß der Genexpressionsveränderungen nach einer Top2b-Deletion ermittelt werden. Dafür wurden wie bereits beschrieben aus isolierten Kardiomyozyten von Top2b-deletierten und nichtdeletierten Tieren 12 Tage nach der letzten TAM-Gabe RNA isoliert. Zur besseren statistischen Auswertung wurden zwei biologische Replikate in unterschiedlichen Sequenzierdurchgängen sequenziert und diese gemeinsam bioinformatisch analysiert.

Abbildung 3.22 A zeigt die Anzahl der differentiell exprimierten signifikanten Gene im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Cre<sup>-</sup>). Insgesamt waren 128 Gene mindestens 2-fach gegenüber der Kontrollgruppe differentiell exprimiert. Von diesen Genen waren 91 hochreguliert, wobei 61 davon eine 2- bis 4-fache und 30 Gene sogar mehr als eine 4-fache Expressionssteigerung zeigten. Es konnten 37 Gene detektiert werden, deren Expression zwischen 2- bis 4-fach vermindert war.

Der Volcano-Plot zeigt die 128 differentiell exprimierten signifikanten Gene nochmals im Vergleich zu allen Genen des Mausgenoms (Abbildung 3.22 B). Die Gesamtheit aller Punkte stellt alle Gene des Mausgenoms dar.

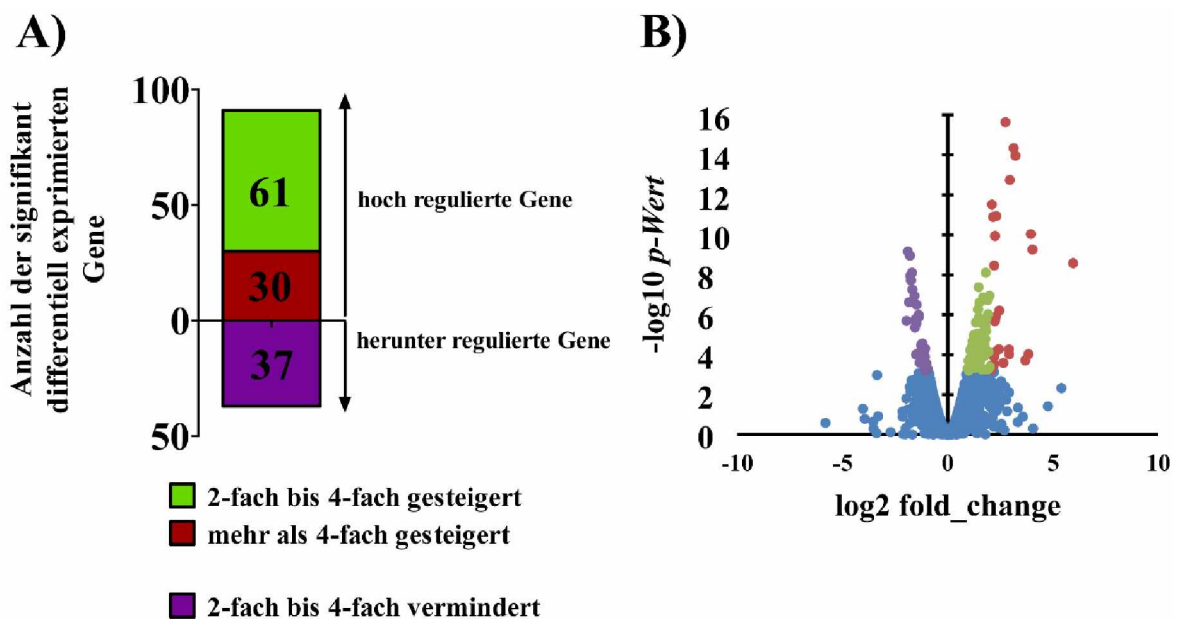


Abbildung 3.22 Anzahl der signifikant differentiell exprimierten Gene 12 Tage nach der *Top2b-Deletion*

Mittels einer Hochdurchsatz-Sequenzierung konnte das vollständige Ausmaß der Genexpressionsveränderung nach einer *Top2b-Deletion* ermittelt werden. In A) wird die Anzahl der signifikant differentiell exprimierten Gene dargestellt. Die Signifikanz bezieht sich auf die beiden Replikate. B) Auf der y-Achse ist logarithmisch der p-Wert aufgetragen, auf der x-Achse der  $\log_2$  der Genexpressionsveränderung der signifikant differentiell exprimierten Gene. Die Gesamtheit **aller** Punkte stellt die Gesamtheit des Mausgenoms dar. Blau dargestellt sind die restlichen Gene des Mausgenoms, die nicht signifikant verändert sind. In A) und B) werden Gene mit einer 2- bis 4-fach gesteigerten Expression gegenüber den nichtdeletierten Tieren in hellgrün, Gene mit einer Expressionssteigerung von über 4 in dunkelrot und die 2- bis 4-fach verminderte Expressionsänderung in lila dargestellt (alle Gene sind im Anhang in Tabelle 6.2 dargestellt).

Zunächst sollte das Ausmaß der *Top2b-Deletion* verifiziert werden. Tabelle 3.1 zeigt robuste FPKM-Werte für die *Top2b* und ein vergleichbares Ausmaß der *Top2b-Deletion* von 64% (RNA-seq) und 71% aus den qPCR-Ergebnissen.

**Tabelle 3.1 FPKM-Werte und vergleichende Genexpressionsveränderungen des Top2b-Genes in RNA-seq und qPCR-Experimenten**

|             | Cre <sup>-</sup><br>Mäuse | Cre <sup>+</sup><br>Mäuse | Genexpressionsänderung<br>(RNA-seq)* |     | Genexpressionsänderung<br>(qPCR)* |     |
|-------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-----|-----------------------------------|-----|
| <b>FPKM</b> | 5,13                      | 2,38                      | 0,46-fach                            | 64% | 0.29-fach                         | 71% |

\* Genexpressionsänderungen immer im Vergleich zu nichtdeletierten Tieren

Mittels des Programms Ingenuity wurden die 128 Gene signifikant regulierten Signalwegen aus den drei Bereichen „Erkrankungen und Störungen“, „molekulare und zelluläre Funktionen“ sowie „physiologische Systementwicklung und -funktionen“ zugeordnet. Tabelle 3.2 zeigt die „Top 5“ der Signalwege in den drei genannten Bereichen. Die differentiell exprimierten Gene konnten kardiovaskulären Erkrankungen (Socs3, Egr1, Cnn1, Nppa), organbedingten Verletzungen und Abnormitäten sowie Entzündungsreaktionen (Fos, Egr1, Serpin1a, Postn) zugeordnet werden. Darüber hinaus sind sie beteiligt an den Signalwegen Zelltod und Zellüberleben (Socs3, Fos, Cd24, Cnn), an der zellulären Funktion und am zellulären Wachstum und Proliferation. Gleichzeitig spielen sie eine Rolle in der Gewebsmorphologie (Socs3, Fos, Cd24a, Postn), in der Bindegewebestruktur und in der kardiovaskulären Systementwicklung und -funktion. Tabelle 3.2 gibt einen genaueren Überblick.

**Tabelle 3.2 Analyse von differentiell regulierten Signalwegen**

Mittels des Programms Ingenuity wurden die differentiell exprimierten Gene signifikanten Signalwegen zugeordnet. Die hier dargestellten Signalwege sind die „Top 5“ der drei Bereiche „Erkrankungen und Störungen“, „molekulare und zelluläre Funktionen“ sowie „physiologische Systementwicklung und -funktion“. Für den jeweiligen „Top 1“ Signalweg der drei Bereiche sind die zwei jeweils am stärksten regulierten Gene angegeben.

| <b>Top 5 der Erkrankungen und biologische Funktionen</b> | <b>Name</b>                              | <b>Gene</b>                     |
|--|--|---------------------------------|
| <b>Erkrankungen und Störungen</b>                        | Kardiovaskuläre Erkrankungen             | Socs3↓, Egr1↓;<br>Cnn1↑, Nppa↑  |
|  | Organische Verletzungen und Abnormitäten |                                 |
|  | Krebs                                    |                                 |
|  | Ernährungsbedingte Erkrankungen          |                                 |
|  | Entzündliche Antworten                   |                                 |
| <b>molekulare und zelluläre Funktionen</b>               | Zelltod und Überleben                    | Socs3↓, Fos↓;<br>Cd24a↑, Cnn↑   |
|  | Zelluläre Anordnung und Organisation     |                                 |
|  | Zelluläre Funktion und Erhaltung         |                                 |
|  | Zelluläre Bewegung                       |                                 |
|  | Zelluläres Wachstum und Proliferation    |                                 |
| <b>physiologische Systementwicklung und</b>              | Gewebsmorphologie                        | Socs3↓, Fos↓;<br>Cd24a↑, Postn↑ |

|                  |   |
|------------------|---|
| <b>-funktion</b> | Bindegewebebestruktur und Entwicklung           |
|                  | Lymphoidale Gewebestruktur und Entwicklung      |
|                  | Organische Entwicklung                          |
|                  | Kardiovaskuläre Systementwicklung und -funktion |

In den RNA-seq Daten waren Gene differentiell exprimiert, die eine durch funktionelle Daten bereits bekannte Kardiomyopathie in Top2b-deletierten Mäusen erklären könnten. So war die Expression von Genen gesteigert, die dafür bekannt sind an Herzschädigungen beteiligt zu sein (Cnn1: 15-fach, Nppa: 9-fach, Postn: 5-fach). Gleichzeitig waren Gene, die bei vorliegender Fibrose verstärkt exprimiert werden (Col3a1: 6-fach, Colla1: 5-fach, Tgfb2: 3-fach, Mmp2: 3-fach) und Entzündungsmediatoren (Cd24a: 16-fach, CD44: 3-fach) hochreguliert.

In den 37 herunterregulierten Genen konnten 11 Transkriptionsfaktoren erkannt werden, in den 91 hochregulierten Genen waren dagegen nur drei Transkriptionsfaktoren (Plagl1, Litaf, Ankrd45) zu finden. Die 11 herunterregulierten Transkriptionsfaktoren beinhalten Fos (0,3-fach), Egr1 (0,3-fach), Fosb (0,31-fach), Snai3, Zfp36, Junb, Jun, Id2, Klf2, Atf3, Nfil3 (0,49-fach). Dem Bereich molekulare und zelluläre Funktionen teilte Ingenuity daraus 9 Gene (Socs3, Fos, Fosb, Zfp36, Junb, Jun, Id2, Gadd45g und Plagl1) dem Signalweg Genexpression zu.

Mit dem Programm STRING (functional protein association networks) konnte gezeigt werden, dass 7 dieser 11 Transkriptionsfaktoren mit dem *immediate early response gene* (Ier2) und der Phosphatase Dusp1 interagieren.

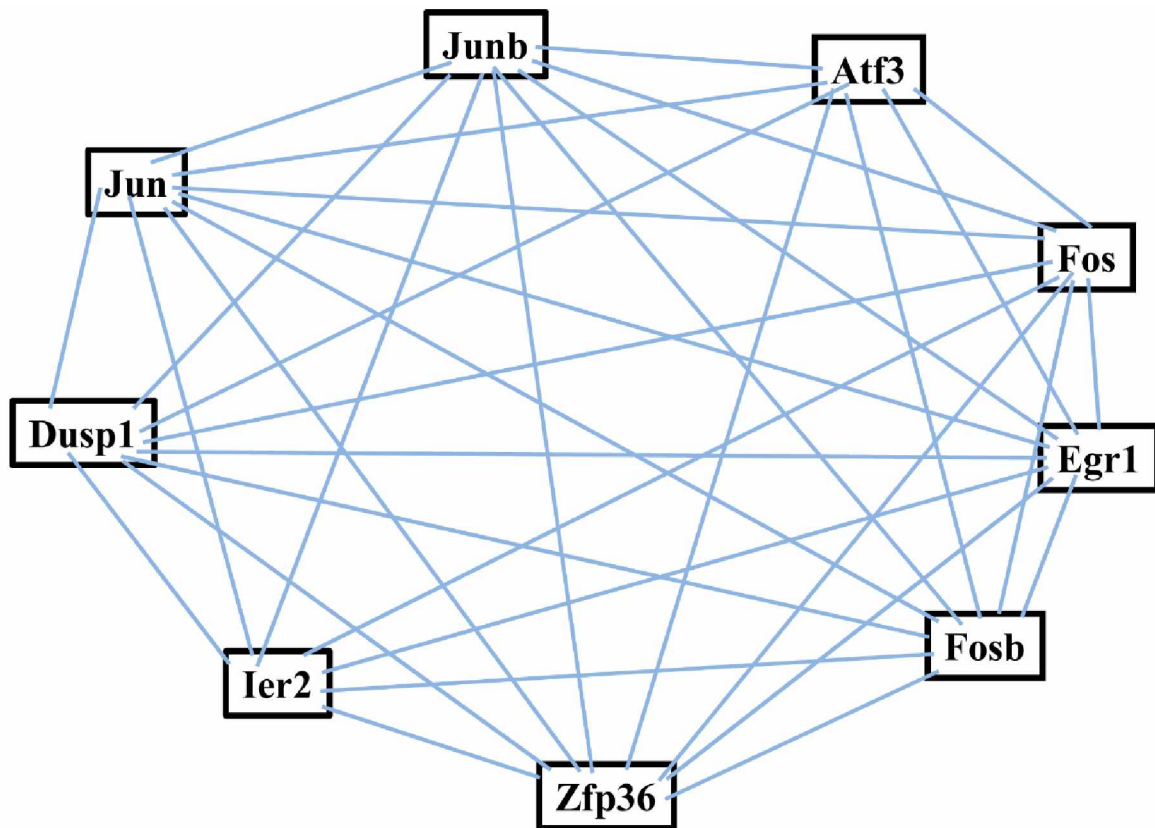


Abbildung 3.23 Interaktion der Transkriptionsfaktoren ermittelt mit STRING

### 3.7 Der genomweite Umfang der Top2b-Bindungscharakteristika mittels Chromatin-Immunpräzitationssequenzierung (ChIP-seq)

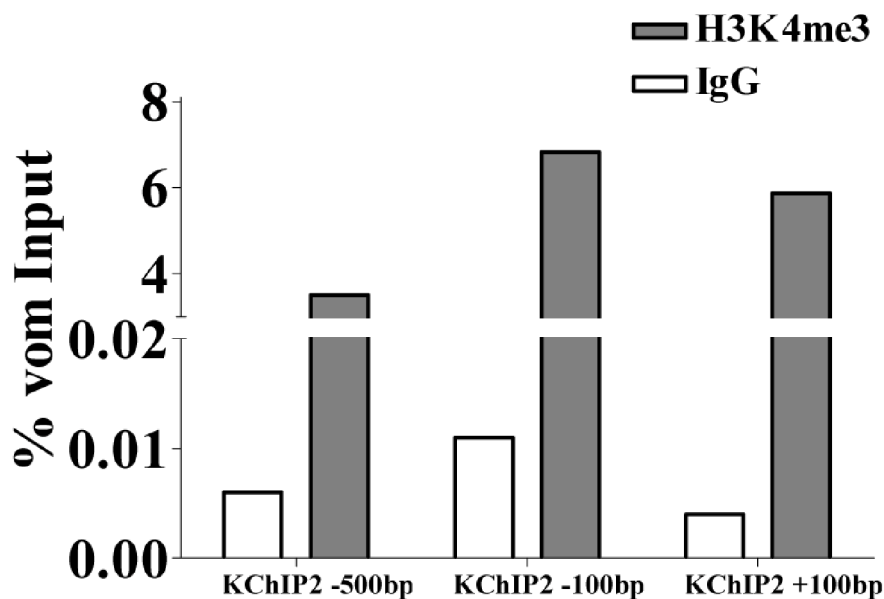
Die Chromatin-Immunpräzitation (ChIP) ist zu einer elementaren Methode für die Bestimmung von Bindungsmodi ausgewählter Proteine an spezifische DNA-Sequenzen geworden (Lee *et al.*, 2006). Da aus technischen Gründen für diesen Versuch keine Kardiomyozyten isoliert werden konnten, wurde die Chromatin-Immunpräzitation an Ganzherzhomogenaten durchgeführt. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden jedoch die Bindungscharakteristika der Top2b nur an embryonalen Stammzellen mittels ChIP-chip Methoden untersucht (Tiwari *et al.*, 2012). Aufgrund der Tatsache, dass das Protokoll der Chromatin-Immunpräzitation für Top2b an Ganzherzhomogenaten nicht bekannt war, sollte das erarbeitete ChIP-Protokoll zunächst auf seine Funktionsfähigkeit überprüft werden.

#### 3.7.1 Kontrolle des Versuchsprotokolls

Dafür wurde eine Chromatin-Immunpräzitation mit einem Antikörper für eine Histonmodifikation (H3K4me3) durchgeführt, die ubiquitär vorkommend ist. In Abbildung

3.24 sind die Quotienten aus den Ct-Werten der IP Probe und der Input-Probe für die drei Promotorregionen des KChIP2-Genes aufgetragen, an denen ein erhöhtes Vorkommen an H3K4me3 bekannt war (Stein *et al.*, 2011). Im Vergleich zu der jeweiligen negativen IgG-Kontrolle konnte für die erste Position 500 bp upstream der Transkriptionsstartseite eine 583-fach erhöhte Bindung des H3K4me3-Antikörpers gezeigt werden. Für die anderen Regionen konnte für 100 bp upstream eine 621-fach und für die Region 100 bp downstream eine 1.465-fach gesteigerte Bindung verglichen mit der jeweiligen IgG-Kontrolle festgestellt werden.

Zum einen konnte mit diesem Versuch gezeigt werden, dass der verwendete Antikörper spezifisch für die ausgewählten Regionen ist, da ausreichend DNA präzipitiert wurde. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass die Hintergrundbindung, ermittelt mit dem IgG-Antikörper, sehr gering war. Mittels dieses Versuches konnten wir sichergehen, dass die gewählten Bedingungen unseres ChIP-Protokolls richtig gewählt waren. In Folge dessen konnten die Top2b-ChIPs durchgeführt werden.



### Promotorregionen des KChIP2 Gens (bezogen auf die TSS)

Abbildung 3.24 Bindung des H3K4me3-Antikörpers an Histone in drei verschiedenen Promotorregionen des KChIP-Genes

Zur Methodenvvalidierung wurde eine ChIP (n= 1 für H3K4me3, n= 1 für IgG) mit dem H3K4me3-Antikörper durchgeführt und die Bindung dieses Antikörpers mit der Bindung von IgG an die drei ausgewählten Promotorregionen von KChIP2 (bezogen auf die TSS) verglichen. Prozent vom Input auf der y-Achse gibt den Anteil an, wie viel % von der gesamten genomischen DNA an die drei Regionen gebunden hat. Die x-Achse gibt die drei Promotorregionen des KChIP Gens an, bezogen auf die Transkriptionsstartseite (TSS).

### 3.7.2 Genomweite Untersuchung der Top2b-Bindungsstellen

Bei der genomweiten Untersuchung der Top2b-Bindungsstellen wurden zwei biologische DNA-Replikate bestehend aus jeweils einer IP-Probe und einer Input-Probe sequenziert. Die Sequenzierungsergebnisse der beiden Replikate waren sehr variabel, was auf die unterschiedlichen Sequenzierungstiefen zurückzuführen ist. So wurden für die IP-Probe aus Replikat 1 59,8 Millionen Sequenzfragmente sequenziert (die Angabe Millionen bezieht sich auf eine Sequenzierrichtung), für die IP-Probe aus Replikat 2 lediglich 35,3 Millionen. Gleiches gilt für die Input-Proben, so wurden für Replikat 1 65,5 Millionen Sequenzfragmente sequenziert und für Replikat 2 nur 36 Millionen. Tabelle 3.3 zeigt die Anzahl der Sequenzfragmente pro Sequenzierrichtung. Für die anschließenden Analysen wurden allerdings ausschließlich Sequenzfragmente verwendet, die nur einmalig an das Mausgenom aligniert wurden. Das waren für Replikat 1 63,71% für die IP-Probe (38,1 Millionen) und 65,41% für die Input-Probe (42,84 Millionen).

Im Folgenden werden nur die Daten für Replikat 1 dargestellt.

*Tabelle 3.3 Anzahl der Sequenzfragmente der ChIP-seq pro Sequenzierrichtung*

|                                   | ChIP-seq Sequenzfragmente                    | Replikat 1 |             |
|-----------------------------------|--|------------|-------------|
|                                   | Parameter                                    | IP-Probe   | Input-Probe |
| <b>Sequenzfragmente („reads“)</b> | total, sequenziert (Millionen)               | 59,8       | 65,5        |
|                                   | total, einmalig aligniert (Millionen)        | 38,1       | 42,84       |
|                                   | total, nicht aligniert (Millionen)           | 6,2        | 7,6         |
|                                   | total, mehr als einmal aligniert (Millionen) | 15,5       | 15          |

Im nächsten Schritt wurden mittels des Programms ngs.plot die Top2b-Bindungsstellen hinsichtlich ihrer Position im Vergleich zu den TSS-Regionen aller Gene des Mausgenoms (mm10) zugeordnet (siehe Abbildung 3.25). Es war erkennbar, dass die höchste Erhebung der IP-Probe bei 200-300 bp downstream der TSS lag. Dies bedeutet, dass die Top2b vorrangig in diesem Bereich gebunden hat. Allerdings ist hier schon festzustellen, dass Top2b somit keinen Einfluss auf basale Promotoren hat.



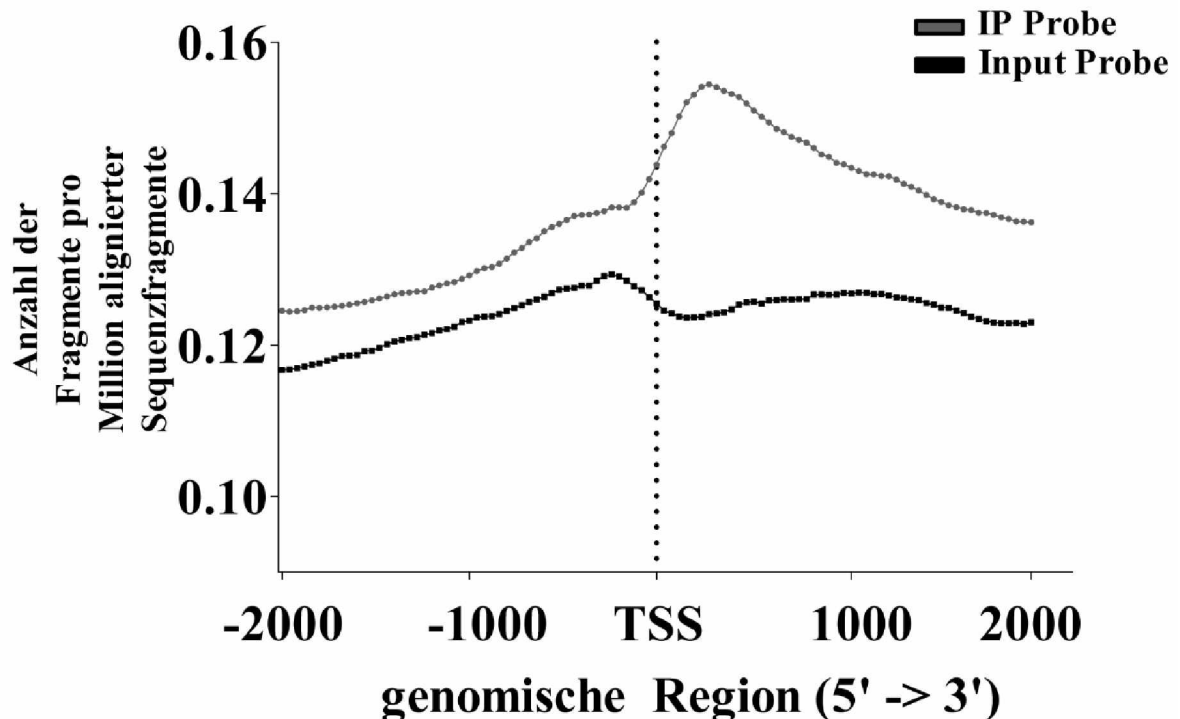


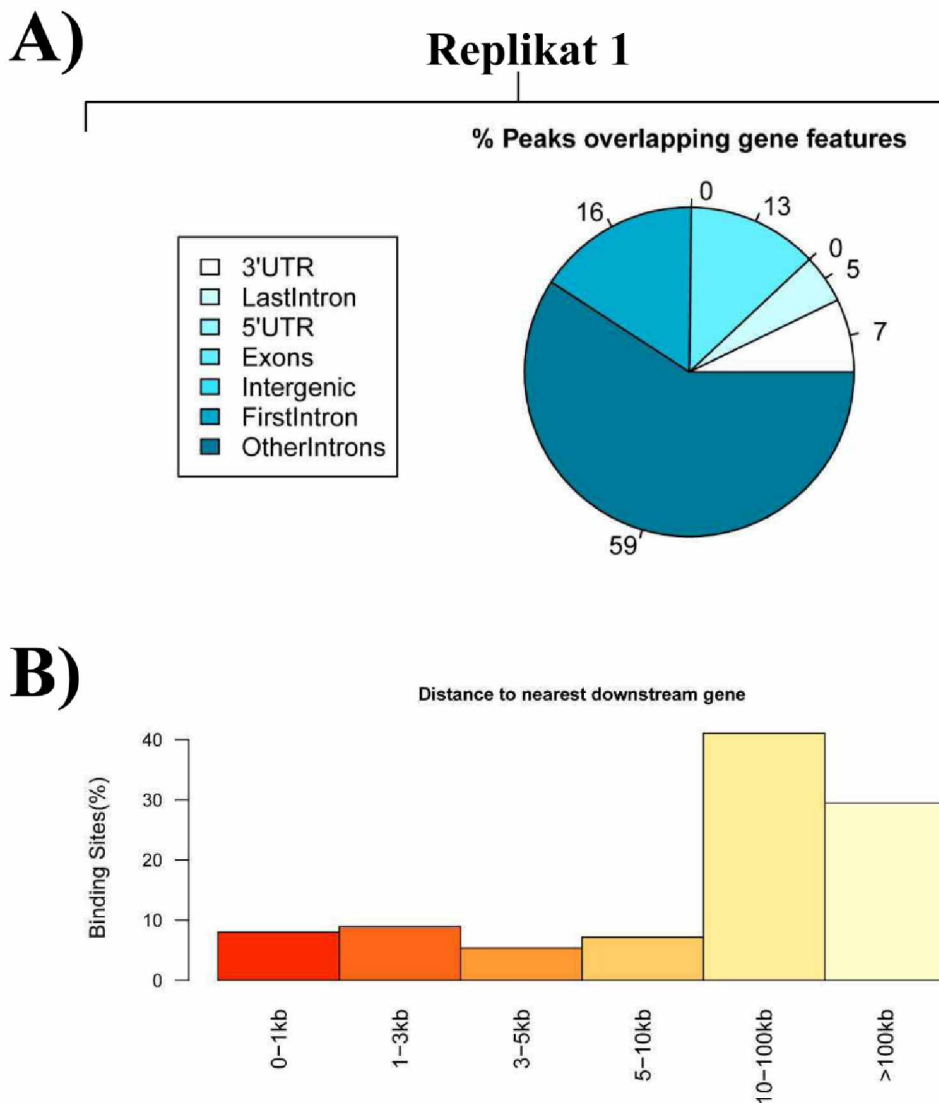
Abbildung 3.25 Zuordnung der Top2b-Bindungsstellen an Transkriptionsstartpunkte aller Gene des Mausgenoms

Die Top2b-Bindungsstellen werden an Transkriptionsstartpunkte aller Gene des Mausgenoms zugeordnet. Die y-Achse zeigt die Anzahl der Fragmente pro Million alignierter Sequenzfragmente. Auf der x-Achse ist zentral der Transkriptionsstart (TSS) aufgetragen, umgeben von 2000 bp up- und downstream. Die Top2b hat vorrangig im Bereich 200-300 bp downstream der TSS gebunden.

Insgesamt wurden bei Replik 1 mit dem Programm MACS2 120 Top2b-Bindungsstellen (Peaks) detektiert. Mit dem PeakAnalyzer konnten 112 Bindungsstellen detektiert werden. Die Differenz von 8 Bindungsstellen zu MACS2 kommt dadurch zustande, dass MACS2 auch nicht bekannte Chromosomen („ChrUn“) in die Analyse miteinschließt. Von den 112 Bindungsstellen lagen 70 innerhalb von Genen (davon zu 59% in Intronbereichen (siehe Abbildung 3.26 A)) und 42 Bindungsstellen im Intergenraum.

Der Bindungsabstand zu dem nächstliegenden Gen ist mit 10-100kb zu weit weg, sodass auch hier von einer direkten Beeinflussung der Top2b in die Gentranskription abgesehen werden kann (Abbildung 3.26 B).

In ChIP-qPCR Experimenten war keine erhöhte Top2b-Bindung an Promotorregionen (-500bp bis TSS (Lyu *et al.*, 2006)) der 11 herunterregulierten Transkriptionsfaktoren zu sehen (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.26 Top2b-Bindungsmuster**

A) zeigt die Top2b-Bindungsstellen hinsichtlich ihrer Lokalisation in verschiedenen Genbereichen mit einer vornehmlichen Bindung in Intronbereichen. B) zeigt, dass die Top2b-Bindungsstellen hinsichtlich ihrer Lokalisation im Intergenraum mit ca. 40% Wahrscheinlichkeit im Bereich zwischen 10 und 100kb zum nächstliegenden Gen liegen.

Tabelle 3.4 zeigt eine Liste mit 9 Genen, in denen die Wahrscheinlichkeit, dass die Top2b bindet am höchsten ist, da sie eine Anreicherung („fold enrichment“) von größer 7 zeigt.

Da die Top2b jedoch nicht an die Promotoren dieser 9 Gene bindet, sondern vielmehr in Intronbereichen, ist eine transkriptionelle Beteiligung der Top2b bei diesen Genen auszuschließen.

Tabelle 3.4 Gene mit der höchsten Wahrscheinlichkeit einer Top2b-Bindung

| chr   | Start     | Ende      | Gennamen       |   | Fold enrichment |
|-------|-----------|-----------|----------------|---|-----------------|
| chr13 | 113877326 | 113877727 | <b>Arl15</b>   | ADP-Ribosylation Factor-Like 151                      | 13,33612        |
| chr11 | 45881150  | 45881524  | <b>Clint1</b>  | Clathrin interactor 1                                 | 9,16341         |
| chr7  | 128690219 | 128690592 | <b>Inpp5f</b>  | Inositol polyphosphate-5-phosphatase F                | 8,26504         |
| chr7  | 67630969  | 67631273  | <b>Lrrc28</b>  | Leucine rich repeat containing 28                     | 7,90569         |
| chr9  | 109003093 | 109003501 | <b>Pfkfb4</b>  | 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4 | 7,72602         |
| chr2  | 128395974 | 128396323 | <b>Gm14005</b> |   | 7,63421         |
| chr2  | 83771492  | 83771836  | <b>Itgav</b>   | Integrin alpha V                                      | 7,36667         |
| chr16 | 28840002  | 28840386  | <b>Mb21d2</b>  | Mab-21 domain containing 2                            | 7,18699         |
| chr3  | 129687090 | 129687450 | <b>Egf</b>     | Epidermal growth factor                               | 7,00732         |

### 3.7.2.1 Verifizierung der ChIP-seq Daten mittels ChIP-qPCR

Im nächsten Schritt sollten die Daten der ChIP-seq mittels ChIP-qPCR überprüft werden. Dafür wurde die Chromatin-Immünpräzipitation an  $n=5$  Tieren wiederholt und die Top2b-gebundene DNA präzipitiert und isoliert. Es wurden von den oben genannten 9 Genen Primer im Bereich der Top2b-Bindungsstelle entworfen. Gleichzeitig wurden Regionen identifiziert, in denen die Top2b nicht gebunden hat; diese Regionen sollten als negative Kontrollen dienen. Die isolierte DNA wurde im Anschluss mittels qPCR gemessen.

Zur visuellen Veranschaulichung wurden die Bindungsstellen mittels IGV betrachtet. Dafür wurden die Sequenzdaten von Replik 1 (IP & Input) in den Viewer hochgeladen. Exemplarisch zeigt Abbildung 3.27 A die Top2b-Bindungsstellen in den Genen Arl15 und Clint1. Fos und Jun dienten als negative Kontrollen, da Top2b an diesen Genen nicht gebunden hat (siehe Abbildung 3.27 B). Die jeweiligen roten Balken zeigen die Sequenzabschnitte, die mit den entworfenen Primern mittels ChIP-qPCR amplifiziert wurden.

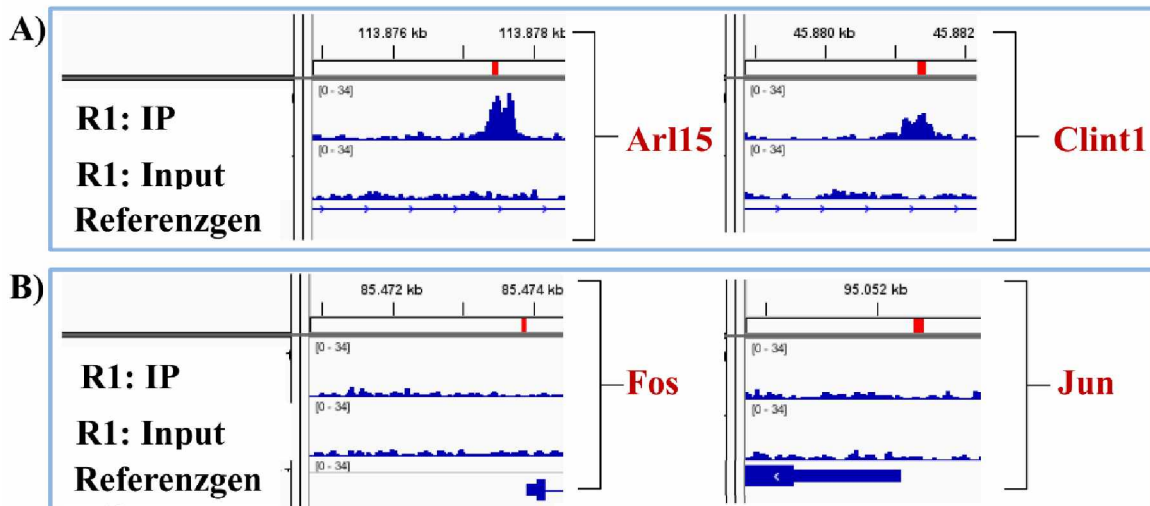


Abbildung 3.27 Visualisierung der *Top2b*-Bindungsstellen mittels IGV

Die Sequenzdaten wurden in den Genomviewer IGV hochgeladen; die *Top2b*-Bindung wurde am Beispiel von *Arl15* und *Clint1* verdeutlicht. *Fos* und *Jun* dienen als negative Kontrollen. Die roten Balken zeigen die bei der ChIP-qPCR amplifizierte DNA-Stücke.

Die ChIP-seq Daten konnten mittels ChIP-qPCR verifiziert werden. In Abbildung 3.28 ist die prozentual gebundene DNA für die neun ausgewählten Gene und für die negativen Kontrollen *Fos* und *Jun* aufgetragen. Es wird deutlich, dass im Vergleich zu *Fos* und *Jun* eine mindestens 8-fache Steigerung der gebundenen DNA bei *Lrrc28* und eine maximale 21-fache Steigerung bei *Arl15* vorliegen.

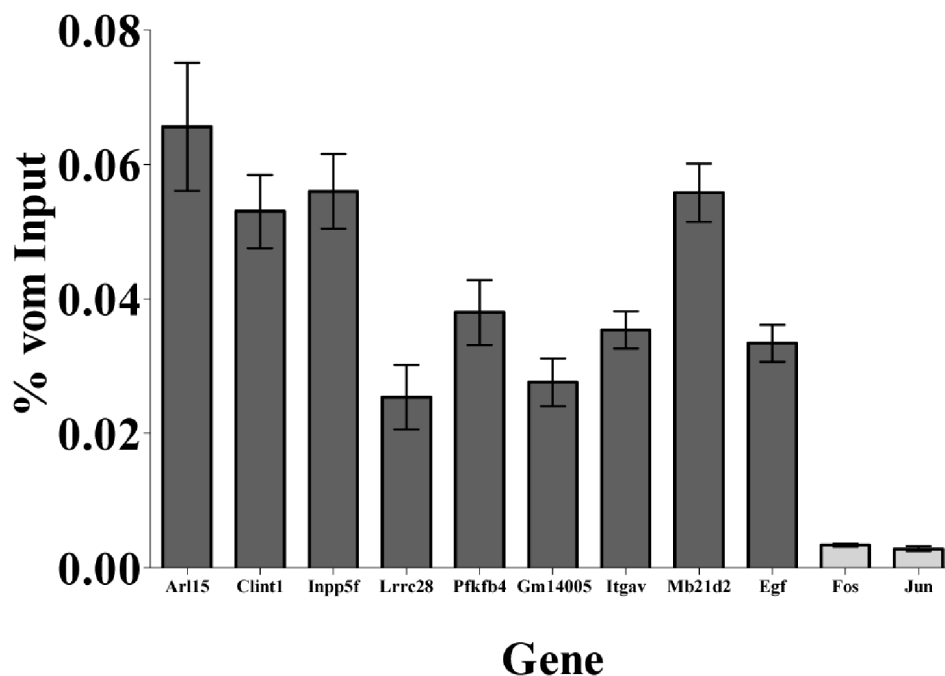


Abbildung 3.28 Bindung von *Top2b* an ausgewählte Gene

Zur Verifizierung der ChIP-seq Daten wurde eine ChIP-qPCR mit dem *Top2b*-Antikörper durchgeführt ( $n=5$ ). Prozent vom Input auf der y-Achse (Mittelwert mit Standardfehler) gibt den Anteil an, wie viel Prozent von der gesamten genomischen DNA an den ausgewählten Bereich gebunden hat. Die x-Achse gibt die Gene an, an denen eine *Top2b*-Bindung untersucht wurde. Die Standardabweichungen sind im Anhang (Tabelle 6.11) dargestellt.

### 3.8 P53 ist involviert in transkriptionellen Veränderungen nach einer Top2b-Deletion

Es gibt Hinweise, dass der Tumorsuppressormarker p53 eine Rolle in der Entstehung der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) spielt. Die „Upstream Analyse“ von Ingenuity prognostizierte, dass p53 aktiviert sein muss, wenn 22 Gene (Tabelle 3.5) aus den 128 differentiell exprimierten Genen in einer bestimmten Weise (hoch- oder herunterreguliert) exprimiert vorliegen (Ingenuity: z-Score: 2,115; p-Wert  $1,26 \cdot 10^{-11}$ ). In den ChIP-seq Daten von Kenzelmann Broz et al. (NCBI-Zugangsnummer: GSE46240) (Kenzelmann Broz *et al.*, 2013) konnte in embryonalen Mausfibroblasten nach einer DOX-Behandlung eine erhöhte Bindung von p53 an Promotorregionen (-1000bp bis +150bp) von *Coll1a1*, *Mmp2*, *Tgfb2* und *Carhsp1* gesehen werden. Diese 4 Gene sind in Tabelle 3.5 in kursiv dargestellt.

Da Zhang et al. zudem zeigten, dass DOX p53 durch eine Top2b-Inhibition in Maus-Herzgeweben aktiviert (Zhang *et al.*, 2012), könnte davon auszugehen sein, dass auch eine Cre-vermittelte Top2b-Deletion zu einer p53-Aktivierung führt.

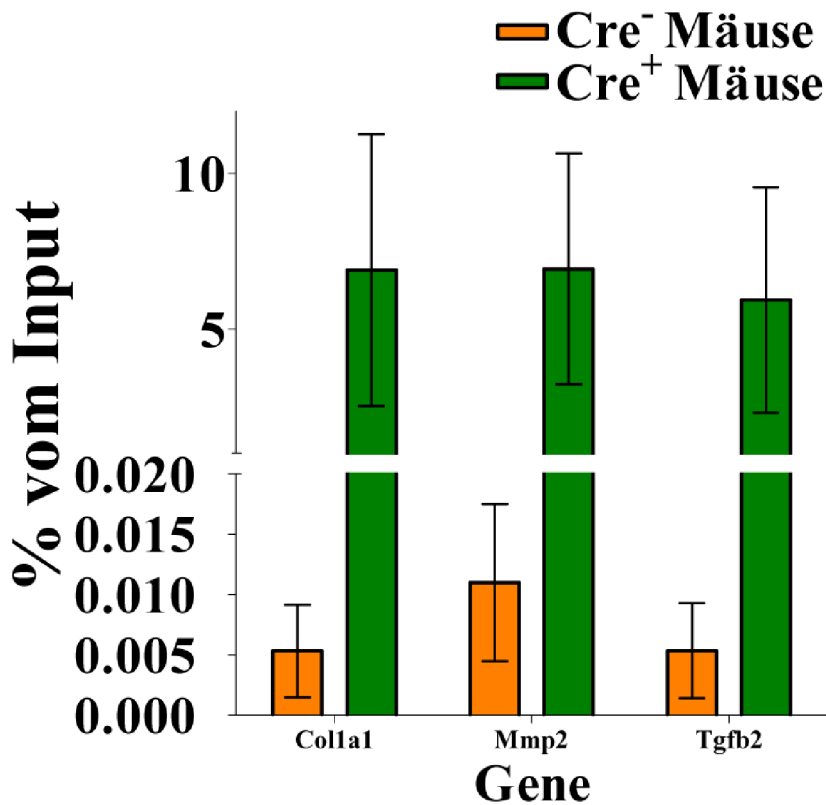
Tabelle 3.5 22 differentiell exprimierte Gene

|                          |                         |                            |         |
|--------------------------|-------------------------|----------------------------|---------|
| Cnn1                     | Cxcl12                  | <b>Mmp2 (2,5-fach ↑)</b>   | Dusp1   |
| Col3a1 (6-fach↑)         | Colla2                  | Ccdc80                     | Gagg45g |
| Postn                    | Col6a2                  | <b>Carhsp1 (2,0-fach↑)</b> | Id2     |
| Col5a2                   | Fn1                     | Myl9                       | Myl4    |
| Krt18                    | Fstl1                   | Lyz2                       |         |
| <b>Colla1 (5-fach ↑)</b> | <b>Tgfb2 (3-fach ↑)</b> | Atf3                       |         |

#### 3.8.1 Gesteigerte p53-Bindung an Promotorbereichen ausgewählter Gene 8 Wochen nach Top2b-Deletion

Zunächst wurde der totale und phosphorylierte p53 Protein-Level mittels Western Blot bestimmt. 2 Wochen nach der Top2b-Deletion wurden an isolierten Kardiomyozyten sowohl die Proteinmenge des Wildtyp p53, als auch die Proteinmenge des aktivierten p53 bestimmt. Es konnten keine Unterschiede in der Proteinmenge zwischen Top2b-deletierten und nichtdeletierten Tieren 2 Wochen nach Implementierung der Deletion gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

Daraufhin wurden Cre<sup>-</sup>- und Cre<sup>+</sup>-Tiere mit TAM (3\*40 mg/kg) behandelt und die Bindung von p53 an Promotorregionen (-1000bp bis +150bp) von *Coll1a1*, *Mmp2* und *Tgfb2* 8 Wochen später mittels ChIP-qPCR untersucht. 8 Wochen nach der Top2b-Deletion konnte eine erhöhte Bindung von p53 an Promotorregionen von *Coll1a1*, *Mmp2* und *Tgfb2* in Top2b-deletierten Tieren gezeigt werden (Abbildung 3.29).



**Abbildung 3.29** Bindung von p53 an Promotorregionen ausgewählter Gene mittels ChIP-qPCR

Die Bindung von p53 an Promotorregionen von Colla1, Mmp2 und Tgfb2 wurden 8 Wochen nach TAM-Gabe an Top2b-deletierten Tieren und an Kontrolltieren untersucht.

Prozent vom Input auf der y-Achse (Mittelwert mit Standardfehler) gibt den Anteil an, wie viel Prozent von der gesamten genomischen DNA an den ausgewählten Bereich gebunden hat. Die x-Achse gibt die Gene an, an denen eine p53-Bindung untersucht wurde. Die Standardabweichungen sind im Anhang (Tabelle 6.12) dargestellt.

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden die klinischen und molekularen Konsequenzen einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion der Top2b näher untersucht und charakterisiert. Zum ersten Mal wurde die Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie in einen kausalen Zusammenhang mit einer Topoisomerase gebracht, deren genetische Inaktivierung eine dilatative Herzschiidung hervorgerufen hat. Im Folgenden soll die Rolle der Top2b sowohl in der normalen Herzfunktion, als auch in der Entstehung der Herzinsuffizienz diskutiert werden. Gleichzeitig soll auf die Bedeutung der Top2b in der Transkription eingegangen werden.

Die Deletion der Top2b und die darauffolgende Entstehung der dilatativen Kardiomyopathie k6nnten den Beginn einer neuen innovativen Herzinsuffizienz-Therapiem6glichkeit darstellen.

### 4.1 Die Top2b ist essentiell zur Aufrechterhaltung der normalen Herzfunktions-Hom6ostase

#### 4.1.1 Eine genetische Top2b-Deletion f6hrt zu funktionellen Verschlechterungen des Herzens

Die in dieser Arbeit pr6sentierten Daten zeigen zum ersten Mal eine Rolle der Top2b in der Entstehung der dilatativen Kardiomyopathie. Kardiomyopathien sind Erkrankungen des Herzmuskels (Abelmann, 1984) und gehen gew6hnlich mit einer Herzinsuffizienz einher (Richardson *et al.*, 1996). Sie werden eingeteilt in die dilatative Kardiomyopathie, die hypertrophe, die restriktive und die arrhythmogene rechtsventrikul6re Kardiomyopathie (Richardson *et al.*, 1996). Die dilatative Kardiomyopathie wird durch systolische Verschlechterungen (reduzierte EF), durch eine Dilatation des linken Ventrikels und durch eine normale oder verminderte Wanddicke gekennzeichnet (Braunwald, 2013a; Richardson *et al.*, 1996; Chen and Chien, 1999). Ursachen f6r eine DCM sind u.a. virale Infektionen, isch6mische Erkrankungen und Mutationen in Genen, die f6r Sarkomer- und Strukturproteine kodieren, und die f6r die Kontraktion erforderlich sind (Stypmann *et al.*, 2002). Die 6tiologie der DCM bleibt in ca. 50% der F6lle jedoch unklar (zusammengefasst in (Stypmann *et al.*, 2002)).

Zur Bestimmung der Herzfunktion von Top2b-deletierten Tieren und Kontrolltieren wurden sowohl Echo-Untersuchungen als auch MRT-Messungen durchgef6hrt. Die Echo stellt die Methode der Wahl zur Erfassung der linksventrikul6ren Funktion dar, da sie sehr

schnell, flexibel und kostengünstig ist (Amundsen *et al.*, 2011; Hess, 2003). Die MRT hingegen ist zwar sehr zeit- und kostenintensiv, gilt aber aufgrund ihrer Exaktheit und Reproduzierbarkeit in der Charakterisierung von Volumen, Masse und Wandbewegung des Herzens als Goldstandard (Amundsen *et al.*, 2011; Dawson *et al.*, 2004; McMurray *et al.*, 2012).

Die Herzfunktion wurde direkt (Zeitpunkt 0), 1, 2, 4, 8, 11 und 16 Wochen nach Implementierung der TAM-induzierten Top2b-Deletion untersucht. Es konnten zu den Zeitpunkten 0, 1, 2 und 4 Wochen keine signifikanten funktionellen Verschlechterungen der Top2b-deletierten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt werden.

Obwohl die funktionelle Untersuchung dieser Zeitpunkte aus logistischen Gründen zunächst mittels Echo vorgenommen wurde, könnte in einem weiteren Anschlussversuch die Herzfunktion für die Zeitpunkte 0, 1, 2 und 4 Wochen nochmals mit einer MRT-Untersuchung wiederholt werden. Aufgrund der erhöhten Auflösungsmöglichkeit der MRT-Technik (Stuckey *et al.*, 2008) könnten dann eventuell auch kleine Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe sichtbar werden. Gegebenenfalls könnte zur verbesserten statistischen Auswertung die Tieranzahl von 4 Tieren pro Gruppe auf 12 Tiere pro Gruppe erhöht werden.

Erst 8, 11 und 16 Wochen nach TAM-Gabe zeigten sich signifikant reduzierte EF- und FS-Werte in Top2b-deletierten Tieren sowohl in Echo- als auch in MRT-Untersuchungen, die begleitet waren von signifikant erhöhten LVEDV und LVESV in Top2b-deletierten Tieren. Diese funktionellen Untersuchungen lassen darauf schließen, dass Top2b-deletierte Tiere 8 Wochen nach TAM-Gabe eine dilatative Kardiomyopathie entwickelt haben, die durch die genannten Parameter wie reduzierte EF sowie durch erhöhte LVEDV und LVESV gekennzeichnet ist; die Volumenerhöhung bringt eine Dilatation des Ventrikels mit sich (McMurray *et al.*, 2012; Zile *et al.*, 2008). Das Schlagvolumen und das Körpergewicht der Top2b-deletierten Tiere blieben unverändert. Das Schlagvolumen ist bei einer systolischen Herzinsuffizienz auch nicht unbedingt vermindert, da es durch die linksventrikuläre Dilatation ausgeglichen werden kann (McMurray *et al.*, 2012).

Eine Zunahme der linksventrikulären Masse die zur Beurteilung einer ventrikulären Hypertrophie betrachtet wurde (McConnell *et al.*, 1999), war nicht zu detektieren.

Passend zu den beschriebenen Daten, waren Mäuse in anderen DCM-Modellen ebenfalls durch signifikant reduzierte FS-Werte und signifikant erhöhte LVEDV und LVESV gekennzeichnet (Chen *et al.*, 2008; McConnell *et al.*, 1999; Nishimura *et al.*, 2001). Bmal1-Knockout Mäuse entwickelten z. B. eine DCM, die durch eine Verdünnung der myokardialen Wand, Dilatation des Ventrikels und durch eine verschlechterte kardiale Leistung (reduzierte FS-Werte) gekennzeichnet war (Lefta *et al.*, 2012). In



echokardiographischen Untersuchungen konnten bei Tieren in einem weiteren DCM Maus-Modell ebenfalls signifikant reduzierte FS-Werte und erhöhte endsystolische Volumina festgestellt werden (Stypmann *et al.*, 2002).

Ob zu diesem Zeitpunkt die vorhandene Herzinsuffizienz kompensiert oder dekompenziert vorliegt, kann nicht eindeutig geklärt werden, da klinische Symptome in die Beurteilung der vorliegenden dilatativen Kardiomyopathie nicht mit einbezogen wurden.

#### **4.1.2 Fibrotische Veränderungen nach einer Top2b-Deletion**

Eine DCM geht mit einer myokardialen Fibrose einher (Sivakumar *et al.*, 2008; Stypmann *et al.*, 2002). In der Histologie ist sie durch übermäßig vorkommende interstitielle fibrotische Bereiche charakterisiert (Yoshikane *et al.*, 1992).

Passend dazu konnte neben den funktionellen Verschlechterungen eine interstitielle Fibrose sowohl in histologischen als auch in elektronenmikroskopischen Untersuchungen in Top2b-deletierten Tieren gesehen werden. Eine präzise Aussage der Lokalisation der fibrotischen Veränderungen (Subendokard etc.) ist nicht zu treffen; vielmehr sind die fibrotischen Akkumulation quer und diffus über das gesamte Myokard verteilt, vorwiegend jedoch im Interstitium, weshalb von einer reaktiven Fibrose auszugehen ist. Eine reaktive Fibrose ist durch eine erhöhte Ablagerung von Kollagen und Extrazellulärer Matrix im Interstitialraum charakterisiert, entfernt von der eigentlich geschädigten Stelle (Brown *et al.*, 2005). Diese Fibrose-Form erscheint als „interstitielle“ oder „perivaskuläre“ Fibrose und steht nicht in direktem Zusammenhang mit einem Myozyten-Verlust (Manabe *et al.*, 2002).

Bradykinin B<sub>2</sub> Rezeptor Knockout-Mäuse entwickelten eine DCM mit erhöhten Bindegewebsablagerungen, sowohl im Endokard als auch verstreut über die ganze Wand (Emanuelli *et al.*, 1999). In einem weiteren DCM Maus-Modell fanden sich ebenfalls interstitielle fibrotische Veränderungen (McConnell *et al.*, 1999).

In die semiquantitative Auswertung der Fibrose wurde sowohl die interstitielle als auch die perivaskuläre Fibrose mit eingeschlossen. 8 und 20 Wochen nach der Implementierung der Deletion konnten in Top2b-deletierten Tieren eine signifikante Zunahme an kollagenen und elastischen Fasern gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe gezeigt werden.

Zur Beurteilung der myokardialen Struktur wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Eine Herzinsuffizienz ist durch eine nicht ausreichende Kontraktion charakterisiert, die oftmals mit einem Defekt in der Anordnung der kontraktilen Apparatur assoziiert ist (Chen *et al.*, 2008). In einigen Regionen konnten 8 Wochen nach TAM-Gabe keine Veränderungen und Störungen in der Sarkomer-Struktur

in den Top2b-deletierten Tieren gesehen werden. An anderen Stellen jedoch war das Sarkomer völlig zerstört und die A-Bande und M-Linie nicht mehr zu erkennen, wodurch die verminderte Kontraktionsfähigkeit der Top2b-deletierten Tieren erklärt werden könnte. Lefta *et al.* führten ebenfalls elektronenmikroskopische Untersuchungen durch, um zu beurteilen, ob die kardialen funktionalen Verschlechterungen in ihrem DCM Maus-Modell mit einer Störung der Sarkomer-Struktur assoziiert waren (Lefta *et al.*, 2012). Auch sie konnten sowohl intakte Sarkomer-Strukturen als auch Sarkomer-Umstrukturierungen erkennen, in denen nicht mehr zwischen der A- und I-Bande unterschieden werden konnte (Lefta *et al.*, 2012).

### 4.1.3 Genexpressionsveränderungen nach einer Top2b-Deletion

2 Wochen nach der TAM-induzierten Top2b-Deletion wurden mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung 128 differentiell exprimierte Gene in isolierten Kardiomyozyten gefunden, die nach Signalweganalysen (Ingenuity) in Prozessen rund um kardiovaskuläre Erkrankungen, Organverletzungen, Entzündungen und Zelltod/Überleben eingeteilt werden konnten. So war die Expression von Genen gesteigert, die für ihre Beteiligung an Herzschädigungen bekannt sind (Calponin 1: 15-fach, atriales natriuretisches Peptid: 9-fach, Periostin: 5-fach).

Calponin 1 (Cnn1) ist ein Troponin-ähnliches Molekül und wird in glatten Muskelzellen exprimiert (Hossain *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2014). Cnn1 ist in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz beteiligt; der Effekt von Cnn1 auf die kardiale Funktion ist jedoch bislang unklar (Lu *et al.*, 2014). Cnn1 ist ein Target der Matrixmetalloproteinase 2 (Castro *et al.*, 2012), die ebenfalls 2,5-fach in Top2b-deletierten Tieren erhöht war; Matrixmetalloproteinasen sind Enzyme, die Kollagene abbauen. Eine mögliche kardiale Funktion von Cnn1 könnte eventuell über diesen Weg erfolgen. Die mRNA-Expression von Cnn1 war in Top2b-deletierten Tieren 15-fach hochreguliert. Die Tatsache, dass Cnn1 einer dilatativen Kardiomyopathie über einen  $\epsilon$ PKX/ERK/mTOR-vermittelten Signalweg entgegen wirken kann (Lu *et al.*, 2014), könnte eventuell die erhöhte Expression von Cnn1 in den Top2b-deletierten Tieren erklären. Dem gegenüber stehen jedoch Studien, in denen gezeigt wurde, dass die Expression von Cnn1 im erkrankten Herzen herunterreguliert war (Lu *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2002).

Periostin (Postn) ist ein extrazelluläres Matrixprotein. Die Expression im adulten Herzen ist zwar relativ gering, aber ausreichend genug um die biomechanischen Eigenschaften des erwachsenen Myokards aufrechtzuerhalten (Zhao *et al.*, 2014). Periostin wird als Regulator für die kardiale Remodellierung betrachtet; gleichzeitig ist es ein Marker für die Diagnose und Schweregrad der Herzinsuffizienz, da die mRNA-Expression von Periostin in verschiedenen Herzerkrankungen wie der dilatativen Kardiomyopathie hoch reguliert ist

(Zhao *et al.*, 2014). Die mRNA-Expression von Postn war in Top2b-deletierten Tieren 5-fach hochreguliert, was das Vorliegen einer Herzerkrankung bestätigen könnte. Außerdem ist Periostin an der Regulation der myokardialen Fibrose beteiligt (Zhao *et al.*, 2014), die in den Top2b-deletierten Tieren ebenfalls vermehrt detektierbar war. Passend dazu zeigten Periostin-deletierte Tiere eine verringerte Fibrose und eine bessere ventrikuläre Leistung im Vergleich zu Wildtypmäusen (Oka *et al.*, 2007).

#### **4.1.3.1 Genexpressionsveränderung der natriuretischen Peptide ANP und BNP**

Die mRNA-Expression des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) war 2 Wochen nach Implementierung der Top2b-Deletion in isolierten Kardiomyozyten 9-fach in Top2b-deletierten Tieren erhöht.

ANP und das natriuretische Peptid Typ B (BNP) sind zwei wichtige Marker, die die Schwere einer Herzinsuffizienz widerspiegeln und deren Sekretion proportional zur vorhandenen linksventrikulären Dysfunktion ansteigt (Yasue *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1996). Das Ausmaß der BNP-Freisetzung ist direkt proportional zur vorhandenen ventrikulären Druck- und Volumenbelastung, zur Wandspannung (Maeda *et al.*, 1998) und zum klinischen NYHA-Stadium (Angermann and Ertl, 2004; Maisel *et al.*, 2003). Aufgrund der Instabilität von ANP und anderer analytischer Schwierigkeiten, werden vor allem Plasmakonzentrationen von BNP und von dem Prohormonfragment NTproBNP zur diagnostischen und prognostischen Klassifizierung der Herzinsuffizienz bestimmt (Braunwald, 2013a; Hess, 2003). ANP wird in gesunden Menschen vorwiegend aus den Vorhöfen sekretiert, bei Patienten mit vorliegender ventrikulärer Dysfunktion jedoch auch aus dem linken Ventrikel; BNP wird hingegen in beiden Patientengruppen lediglich aus dem linken Ventrikel freigesetzt (Yasue *et al.*, 1994). Die gesteigerte Sekretion beider Peptide wird sowohl durch die Zunahme der Wandspannung als auch durch die Aktivierung anderer neurohumoraler Systeme reguliert (Yasue *et al.*, 1994; Angermann and Ertl, 2004). Ein überproportionaler Anstieg dieser natriuretischen Peptidkonzentration (vor allem des BNP) ist daher ein Kennzeichen für das Vorliegen einer Herzinsuffizienz (Mosterd and Hoes, 2007; Angermann and Ertl, 2004).

Trotz der bereits bekannten 9-fachen gesteigerten ANP mRNA-Expression 2 Wochen nach Implementierung der Deletion, sollten die mRNA-Expressionslevel von ANP und BNP in Ganzherzhomogenaten mittels quantitativer qPCR direkt (Zeitpunkt 0), 1, 2, 4, 8 und 20 Wochen nach der Top2b-Deletion bestimmt werden (siehe Abbildung 3.14). Die mRNA-Expression von ANP stieg über den genannten Zeitverlauf kontinuierlich an und erreichte eine 2,7-fache Steigerung nach 4 Wochen und eine 9-fache Steigerung 8 Wochen nach Implementierung der Deletion in Top2b-deletierten Tieren im Vergleich zum Zeitpunkt 0.

Die BNP-Expression stieg linear über den Zeitverlauf an und erreichte eine 6,7-fache Steigerung in Top2b-deletierten Tieren und eine 3-fache Steigerung in den Kontrolltieren 8 Wochen nach Implementierung der Deletion, im Vergleich zum Zeitpunkt 0. Möglicherweise könnte TAM alleine in den Kontrolltieren eine Steigerung der BNP-Expression ausgelöst haben, wobei diese Vermutung bereits widerlegt wurde (Lexow *et al.*, 2013). 4 und 8 Wochen nach Implementierung der Deletion konnten jedoch signifikante Unterschiede in der BNP-Expression zwischen Cre<sup>+</sup> und Cre<sup>-</sup> verzeichnet werden, weshalb der geringe Expressionsanstieg in den Kontrolltieren zu vernachlässigen ist.

Im Gegensatz zu den funktionellen Untersuchungen, in denen zu den frühen Zeitpunkten 0, 1, 2 und 4 Wochen keine Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den Top2b-deletierten Tieren gezeigt werden konnten, waren auf mRNA-Ebene bereits ein Anstieg der ANP- und BNP-Expression in den Top2b-deletierten Tieren deutlich, der auf eine kardiale Erkrankung hindeutet (Angermann and Ertl, 2004). BNP wird gleichzeitig eine antifibrotische Funktion zugesprochen, da fibrotische Läsionen in BNP-deletierten Tiere im Vergleich zu Wildtyptieren vermehrt auftraten (Tamura *et al.*, 2000). Nachdem in Mäusen das Gen, das für den natriuretischen Peptidrezeptor A kodiert, deletiert wurde, konnte ein vermehrtes Vorkommen von Bluthochdruck gezeigt werden (Oliver *et al.*, 1997), was jedoch aufgrund der natriuretischen und vasodilatierenden Wirkung von ANP zu erwarten war (Stein and Levin, 1998). In einem weiteren Knockout-Modell wurden zudem erhöhte ANP und BNP mRNA-Expressionen in Zusammenhang mit einer kardialen Dysfunktion und einer linksventrikulären Dilatation gebracht (Nakai *et al.*, 2007).

Eine Unterscheidung zwischen diastolischer und systolischer Herzinsuffizienz ist anhand der BNP-Spiegel jedoch nicht möglich (Angermann and Ertl, 2004). Die Symptome einer Herzinsuffizienz sind sehr unspezifisch und viele Patienten werden trotz einer vermuteten Herzinsuffizienz nach echokardiographischen Untersuchungen als gesund erklärt (McMurray *et al.*, 2012). Dies könnte eventuell auch einen negativen Befund der Echo-Untersuchung zu den früheren Zeitpunkten erklären. Die Blutkonzentrationsmessung der natriuretischen Peptide stellt daher eine sinnvolle Alternative dar, um den Krankheitsverlauf der Patienten einschätzen zu können (McMurray *et al.*, 2012).

#### **4.1.3.2 Genexpressionsveränderung fibrotischer Marker**

In den RNA-seq Daten waren in Top2b-deletierten Tieren Kollagen Typ I (Col1a1: 5-fach), Kollagen Typ III (Col3a1: 6-fach), der transformierende Wachstumsfaktor Tgfβ2 (3-fach) und die Matrixmetalloproteinase 2 (Mmp2: 3-fach) differentiell exprimiert.

Neben den Daten aus der RNA-Sequenzierung wurden die mRNA-Expressionslevel von Col1a1, Col3a1, Tgfβ1 und Tgfβ2 in Ganzherzhomogenaten mittels quantitativer qPCR

direkt (Zeitpunkt 0), 1, 2, 4, 8 und 20 Wochen nach der Top2b-Deletion bestimmt (siehe Abbildung 3.19).

Die mRNA-Expression der beiden Kollagene Col1a1 und Col3a1 stieg in den Top2b-deletierten Tieren über den Zeitverlauf an und zeigte signifikante Unterschiede zwischen der Top2b-deletierten Gruppe und der Kontrollgruppe zu den Zeitpunkten 1, 4, 8 und 20 Wochen. 8 Wochen nach der Implementierung der Deletion konnte eine 4,3-fache (Col1a1) und 6,4-fache (Col3a1) gesteigerte Expression in den Top2b-deletierten Tieren im Vergleich zum Zeitpunkt 0 festgestellt werden. Die bereits histologisch und elektronenmikroskopisch gezeigte vermehrte interstitielle Fibrose konnte durch die gesteigerten Kollagen-Expressionen in Top2b-deletierten Tieren untermauert werden, da eine erhöhte Synthese und Akkumulation von fibrillärem Kollagen (Kollagen Typ 1 und Typ III) im kardialen Interstitium ein Kennzeichen für das Vorliegen einer kardialen Fibrose darstellt (Kong *et al.*, 2013). In einer klinischen Studie konnte in DCM-Patienten (EF <50%) eine erhöhte mRNA-Expression sowohl von Col1a1 (2 – 6-fach) als auch von Col3a1 (2-fach) in endomyokardialen Biopsien im Vergleich zu Patienten mit einer EF >50% festgestellt werden (Pauschinger *et al.*, 1999). In einer weiteren Studie stieg die Kollagen-Konzentration von Kollagen Typ I (18%) und von Kollagen Typ III (33%) in DCM-Patienten im Vergleich zu gesunden Patienten (Sivakumar *et al.*, 2008). Yoshikane und Bishop zeigten ebenfalls Zunahmen von kollagenen Fasern im Endstadium der DCM (Bishop *et al.*, 1990; Yoshikane *et al.*, 1992).

Der transformierende Wachstumsfaktor Tgf $\beta$  ist ein pleiotropes Zytokin und involviert in der kardialen Schädigung, in der Reparatur sowie in der kardialen Remodellierung u.a. durch eine erhöhte Synthese der ECM-Proteine (Dobaczewski *et al.*, 2011). Es gibt drei Isoformen von Tgf $\beta$  (Tgf $\beta$ 1, Tgf $\beta$ 2 und Tgf $\beta$ 3) (Ghosh *et al.*, 2013), wobei die spezifische Rolle der drei Isoformen in der kardialen Remodellierung noch unklar ist (Dobaczewski *et al.*, 2011). Trotz alledem ist Tgf $\beta$ 1 wohl die prävalente Isoform im kardiovaskulären Bereich (Kong *et al.*, 2013).

Die mRNA-Expression von Tgf $\beta$ 1 und Tgf $\beta$ 2 war zu den Zeitpunkten 4 Wochen, 8 Wochen und 20 Wochen in Top2b-deletierten Tieren signifikant gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe hochreguliert.

Passend zu den fibrotischen Akkumulationen und den erhöhten Tgf $\beta$ 1 und Tgf $\beta$ 2 mRNA-Expressionen in Top2b-deletierten Tieren, konnten Dobaczewski *et al.* zeigen, dass die myokardiale Tgf $\beta$ -Expression in kardialen Hypertrophie- und Fibrose-assoziierten Mausmodellen deutlich hochreguliert war (Dobaczewski *et al.*, 2011). Gleichzeitig entwickelten Tgf $\beta$ 1-überexprimierende Mäuse eine induzierte ventrikuläre Fibrose, die mit einer erhöhten Kollagenablagerung und einer Hemmung der interstitiellen Kollagenase einherging (Seeland *et al.*, 2002). Heterozygote Tgf $\beta$ 1-deletierte Tiere zeigten dagegen

eine verminderte myokardiale Fibrose und eine verringerte myokardiale Steifigkeit im Vergleich zu Wildtyptieren (Brooks and Conrad, 2000). Gleichzeitig konnte Tgfb2 die Produktion von Kollagen Typ III in kardialen Rattenfibroblasten steigern (Sivakumar *et al.*, 2008). Die Tatsache, dass die Promotoren von Col1a1 und Col3a1 ein Tgfb-aktivierendes Element besitzen, könnte die gesteigerte Kollagensynthese in Top2-deletierten Tieren erklären (Ritzenthaler *et al.*, 1991).

In DCM-Patienten (EF <50%) war die mRNA-Expression von Tgfb1, Tgfb2 und Mmp-2 im Vergleich zu gesunden Probanden deutlich erhöht (Pauschinger *et al.*, 1999; Sivakumar *et al.*, 2008), was die 3-fache mRNA-Expressionssteigerung von Mmp-2 in Top2b-deletierten Tieren rechtfertigen könnte.

#### **4.1.4 Genetische Top2b-Deletion mündet in eine dilatative Kardiomyopathie und geht mit Genexpressionsveränderungen einher**

Es gilt festzuhalten, dass eine konditionelle zeit- und gewebsspezifische Top2b-Deletion in eine dilatative Kardiomyopathie mündet, die mit Veränderungen der Genexpression einhergeht. Yang *et al.* und Lyu *et al.* zeigten bereits, dass eine konstitutive und organspezifische Top2b-Deletion deutliche und schließlich letale phänotypische Auswirkungen mit sich brachte (Lyu and Wang, 2003; Yang *et al.*, 2000), die ebenfalls mit Veränderungen der Genexpression assoziiert waren (siehe 1.1.6) (Ju *et al.*, 2006; Lyu *et al.*, 2006; Tiwari *et al.*, 2012).

Die Top2b ist demnach nicht nur ein essentielles Enzym für die neuronale Entwicklung (Lyu and Wang, 2003; Yang *et al.*, 2000), sondern auch für die Aufrechterhaltung der Homöostase des Herzens und der normalen Herzfunktion.

2012 wurde durch Zhang *et al.* jedoch gezeigt, dass eine konditionelle Top2b-Deletion keine Auswirkungen auf die Herzfunktion hat und dass die Top2b in Folge dessen keine Rolle in der normalen Homöostase der Herzfunktion spielt (Zhang *et al.*, 2012). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Experimentdesign unterscheidet sich jedoch in einigen wichtigen Punkten von dieser Publikation.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Ausmaß der Top2b-Deletion 2 Wochen nach der letzten TAM-Gabe quantitativ bestimmt und eine Deletion des Top2b-Lokus von 65-70% detektiert. Die Deletionsrate befindet sich in einem mittleren Bereich während eine Gendeletion von über 80% nach einer kumulativen Dosis von 100 mg/kg TAM eine gute und eine 50%-ige Gendisruption eine schlechte Rekombinationseffizienz darstellt (Andersson *et al.*, 2010; Sohal *et al.*, 2001). Bei der Auswahl des TAM-Behandlungsschemas muss die Rekombinationseffizienz immer gegen die möglich

auftretende Toxizität abgewägt werden (Hayashi and McMahon, 2002). Während in der vorliegenden Arbeit das Ausmaß der Top2b-Deletion sowohl qualitativ als auch quantitativ untersucht wurde, wurde bei Zhang et al. die Deletion qualitativ mittels immunfluoreszierenden Methoden und mittels Western Blot gezeigt; eine quantitative Top2b-Deletion wurde nicht dargestellt (Zhang *et al.*, 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurden 5 bis 7 Monate alte Mäuse verwendet. Die bei Zhang et al. (Zhang *et al.*, 2012) eingesetzten Tiere entstammten zwar demselben Mutanten-Stamm, sie waren allerdings mit einem Alter von 4 Wochen deutlich jünger als die Mäuse mit denen in der vorliegenden Arbeit gearbeitet wurden. Da die Herzinsuffizienz jedoch ein Problem des Alters darstellt und die Prävalenz an einer Herzinsuffizienz zu erkranken mit steigendem Alter zunimmt (Braunwald, 2013a), wird durch die Verwendung der älteren Mäuse ein besseres Modell gewährleistet als mit 4 Wochen alten Tieren.

Mit zunehmendem Alter sind sowohl zusätzlich auftretende Komorbiditäten als auch die Frequenz an Kardiomyozyten-Untergängen steigend (Braunwald, 2013a). Ein zusätzlicher Untergang an Kardiomyozyten kann von einem 20 Jahre alten Patienten daher besser kompensiert werden als von einem 80-jährigen (Braunwald, 2013b). Ein bereits älteres Herz wie das in den 5 bis 7 Monate alten Tieren kann daher stärker auf eine Herzschädigung reagieren als ein Herz von 4 Wochen alten Tieren. Die jüngeren Tiere könnten daher eine Top2b-Deletion besser verkraften als die klinisch relevanteren älteren Tiere.

#### **4.1.4.1 Die entstandene dilatative Kardiomyopathie ist kein Cre-Effekt**

Die Cre-LoxP Technologie ist eine weit verbreitete Methode zur gewebspezifischen Gen Deletion in der Maus (Kos, 2004). Die exprimierte Cre-Rekombinase (38 kDa) erkennt die 34 bp-lange LoxP-Sequenz, die ausgewählte DNA-Segmente eines gewünschten Genes flankiert (Ghosh and Van Duyne, 2002; Kos, 2004). Die Cre-Rekombinase bindet an den LoxP-Seiten und das entsprechende DNA-Segment wird ausgeschnitten. Eine temporäre und räumlich festgelegte Deletion eines Gens wird über Promotoren geregelt, die die Expression der Cre-Rekombinase zell- oder gewebspezifisch regulieren (Kos, 2004; Lexow *et al.*, 2013).

Die Cre-LoxP-Methode zur Generierung konditioneller Gendelektionen ist sehr verbreitet; trotzdem gibt es sehr wenige Informationen bezüglich der richtigen TAM-Dosierung, des Zeitverlaufs der Gendisruption und der Aussage, welche Darreichungsform von TAM die höchste Gendisruptions-Effizienz im Myokard bewirkt (Andersson *et al.*, 2010). Die optimale Dosis und Dauer der TAM-Administration kann daher sehr stark variieren, je nachdem wie stark die Cre-Rekombinase im jeweiligen Stamm exprimiert ist und wie

zugänglich die zu schneidende DNA-Sequenz für die Cre-Rekombinase ist (Hougen *et al.*, 2010; Koitabashi *et al.*, 2009).

Obwohl Studien keine funktionellen Verschlechterungen in TAM behandelten MerCreMer-tragenden Tieren zeigen konnten (Hall *et al.*, 2011; Sohal *et al.*, 2001), gibt es zunehmende Hinweise einer transient entstehenden Kardiomyopathie in TAM-induzierten MerCreMer-tragenden Tieren, die mit transkriptionellen Veränderungen verbunden ist (Hougen *et al.*, 2010; Lexow *et al.*, 2013). Die Kardiomyopathie äußert sich in einer verringerten linksventrikulären systolischen Verkürzungsfraction innerhalb der ersten Woche nach der TAM-Applikation (Hall *et al.*, 2011). Diese Kardiomyopathie ist zwar nach 28 Tagen nicht mehr detektierbar und daher transient verlaufend, aber sowohl in Cre-Rekombinase-tragenden geflochten Tieren als auch in ungeflochten Cre-Rekombinase-tragenden Tieren vorkommend; geflochte Tiere jedoch, die die Cre-Rekombinase nicht exprimierten, zeigten keine Einschränkungen in der Herzfunktion (Koitabashi *et al.*, 2009). Lexow *et al.* zeigten, dass die Herzschädigung charakterisiert durch verminderte EF-Werte und signifikante fibrotische Veränderungen auch 6 - 7 Wochen nach TAM-Gabe noch anhielt (Lexow *et al.*, 2013). Der kardiotoxische Effekt ist nicht gänzlich erklärt. Da unbehandelte MerCreMer-tragende Tiere über die Zeit keine kardialen oder morphologischen Verschlechterungen zeigten, kann weder eine zytoplasmatisch vorliegende Cre-Rekombinase noch TAM alleine eine kardiale Dysfunktion auslösen (Lexow *et al.*, 2013).

Aufgrund der oben aufgeführten Problematik sollten TAM behandelte MerCreMer-Rekombinase-tragende ungeflochte Tieren (Cre<sup>+</sup>-WT) als Kontrolle mitgeführt werden (Koitabashi *et al.*, 2009; Lexow *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2012). Mit dieser können alleinige Effekte der Cre-Rekombinase nachgewiesen werden. So war es in einem Kontrollexperiment möglich zu zeigen, dass sich die entstandene dilatative Kardiomyopathie aufgrund einer Top2b-Deletion manifestiert und nicht nur einen Effekt der Cre-Rekombinase darstellt.

## **4.2 Die Rolle der Top2b in der Entstehung der Herzinsuffizienz**

### **4.2.1.1 Die Aktivierung von p53 steht in Zusammenhang mit einer Top2b-Deletion**

#### **P53 als Wächter des Genoms**

P53 ist ein Schlüsselmolekül in vielen human vorkommenden Krebsarten. Es ist ein potenter Tumorsuppressor (Oren and Rotter, 1999) und wird als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Lane, 1992). Es schützt über eine Aktivierung von spezifischen



zellwachstumsregulierenden Signalwegen die Zellen vor unkontrolliertem Wachstum und verhindert somit mögliche Tumorentstehungen (Brooks and Gu, 2010).

Das humane p53 ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 53kDa; es besteht aus drei funktionellen Domänen, der N-terminalen Domäne und den beiden DNA-Bindungsdomänen: der zentralen und der C-terminalen Domäne, die ebenfalls die Oligomerisierungsdomäne besitzt (Sakaguchi *et al.*, 1998). Durch die Interaktion der N-terminalen Domäne mit der Transkriptionsmaschinerie kann p53 Einfluss auf die Transkription nehmen. Voraussetzung dafür ist die Bindung von p53 an bestimmte DNA-Sequenzen, die über die zentrale Domäne des p53 Proteins ermöglicht wird (Brady and Attardi, 2010). Durch die Oligomerisierungsdomäne wird das Protein zu einem Tetramer zusammengefügt (Brady and Attardi, 2010), wodurch die Aktivität des Proteins entfacht werden kann. Die C-terminale Domäne schließlich ist in der Lage, unspezifische DNA- und RNA-Bindungen auszubilden (Brady and Attardi, 2010). Durch Modifikationen auf dieser Domäne lässt sich die sequenzspezifische DNA-Bindungsaktivität der zentralen Domäne positiv beeinflussen.

Das nichtmutierte Wildtyp p53 (Wtp53) liegt in normalen Zellen in einem ruhenden Zustand vor. Der Steady-State Level des ruhenden p53 Proteins ist sehr niedrig, wodurch ein schneller proteolytischer Abbau möglich ist (Brooks and Gu, 2010; Oren and Rotter, 1999; Sakaguchi *et al.*, 1998). Die relativ geringen Proteinmengen beruhen auf einer Interaktion mit Mdm2, da Mdm2 über einen Ubiquitin-Proteasom abhängigen Signalweg vermittelnd, als negativer Regulator agiert (Brooks and Gu, 2010). Aufgrund von DNA-schädigenden Reizen spaltet sich der p53-Mdm2 Komplex, die negative Regulation durch Mdm2 entfällt und eine initiale Stabilisierung beginnt (Brooks and Gu, 2010). Posttranslationale Modifikationen wie Acetylierung und Phosphorylierung treten ein, dadurch wird die sequenzspezifische Transaktivierungsfähigkeit aktiviert und durch Bindung von p53 an die DNA wird die Transkription von verschiedenen downstream Regulatoren angeregt (Brooks and Gu, 2010).

### **Gesteigerte Bindung von p53 an Colla1-, Tgf $\beta$ 2- und Mmp2-Promotorregionen in Top2b-deletierten Tieren**

Basierend auf der Datenbank Ingenuity gibt es Hinweise, dass der Tumorsuppressormarker p53 aktiviert sein muss, wenn die 22 Gene aus Tabelle 3.5 2 Wochen nach der Top2b-Deletion differentiell exprimiert vorliegen. Jedoch konnte auf Proteinebene 2 Wochen nach TAM-Gabe keine erhöhte p53-Aktivität in Top2b-deletierten Tieren gesehen werden. Gleichzeitig war die Proteinmenge des nichtmutierten Wildtyps p53 in Cre<sup>-</sup>- und Cre<sup>+</sup>-Tieren ebenfalls unverändert. In einer anschließenden CHIP-qPCR Untersuchung konnte 8 Wochen nach Implementierung der Top2b-Deletion jedoch eine erhöhte Bindung von p53 an ausgewählten Promotorregionen (-1000bp bis +150bp) von Colla1, Mmp2 und Tgf $\beta$ 2

in Top2b-deletierten Tieren gezeigt werden. Diese Daten stimmen mit Ergebnissen der ChIP-seq Analyse aus Kenzelmann Broz *et al.* überein, in der in embryonalen Mausfibroblasten nach einer DOX-Behandlung ebenfalls eine erhöhte Bindung von p53 an Promotorregionen von Colla1, Mmp2 und Tgfb2 gesehen werden konnte (Kenzelmann Broz *et al.*, 2013).

Eine verstärkte Bindung von p53 an Promotorregionen dieser Genen, die in die kardiale Fibrose impliziert werden (siehe 4.1.3.2), könnte die entstandene Fibrose in den Top2b-deletierten Tieren erklären. Dazu passend führte eine hepatozytisch-spezifische Mdm2-Deletion in Mäusen zu einer endogenen p53 Akkumulation und zu einer Transaktivierung von p53-regulierenden Genen (p21, Noxa und Bax) (Kodama *et al.*, 2011). Diese Tiere entwickelten eine hepatische Fibrose, die einherging mit signifikant gesteigerten Colla1, Colla2 und CTGF Expressionen sowie mit erhöhten Mmp2 Expressionen (Kodama *et al.*, 2011); die Tgfb1 Expression war ebenfalls erhöht. Mdm4 (Homolog von Mdm2)-deletierte Tiere entwickelten ebenfalls aufgrund einer gesteigerten Kardiomyozyten-Apoptose eine DCM die eine Fibrose und Herzinsuffizienz mit sich zog (Xiong *et al.*, 2007).

Im Gegensatz dazu jedoch hob p53 die Tgfb-induzierte Kollagen-Synthese in dermalen Fibroblasten auf (Ghosh *et al.*, 2004). Dermale Fibroblasten wurden transient mit einem p53-Vektor transfiziert und mit Tgfb inkubiert. Nach einer 48-stündigen Inkubation konnte in Immunblot-Analysen gezeigt werden, dass eine ektopische p53-Expression den zellulären Kollagen-Level in An- und Abwesenheit von Tgfb signifikant reduzierte (Ghosh *et al.*, 2004). Um den zugrundeliegenden Mechanismus der p53-abhängigen Kollagen-Gen-Regulation zu untersuchen, wurden Fibroblasten mit einem p53-Vektor und mit einem Colla2-CAT-Reporter transfiziert. Durch eine ektopische Expression von p53 wurde die basale Colla2 Promotor-gesteuerte transkriptionale Aktivität reprimiert und eine Stimulation durch Tgfb verhindert (Ghosh *et al.*, 2004). Gleichzeitig hemmte eine durch Etoposid-induzierte zelluläre p53-Stimulation die Tgfb-induzierte Kollagen-Synthese und deren Transkription (Ghosh *et al.*, 2004). P53 ist ein endogener Repressor der Kollagen-Synthese, da in p53 Knockout-Fibroblasten die Kollagen Typ 1 Expression signifikant im Vergleich zu Wildtyp-Fibroblasten gesteigert war (Ghosh *et al.*, 2004). In einem Ratten-Modell mit akutem Nierenversagen verschlimmerte eine p53-Inhibition durch Pifithrin sogar die Bildung einer Fibrose (Dagher *et al.*, 2012).

In zwei weiteren Herzinfarkt-Mausmodellen wurde in Wildtyp-Tieren, in heterozygoten und in homozygoten p53-Knockout-Tieren die linke Koronararterie ligiert; fibrotische Veränderungen wurden mittels Masson-Färbung und Sirius-Rot-Färbung analysiert. 3 Tage nach der Ligation konnten keine Unterschiede hinsichtlich der interstitiellen Fibrose in allen drei Genotypen gezeigt werden; gleichzeitig blieb die Expression von Mmp2 unverändert (Matsusaka *et al.*, 2006). 7 Tage nach der Ligation konnten in einer anderen

Studie in p53-Knockout-Tieren jedoch erhöhte fibrotische Areale, erhöhte Expressionen von Kollagen Typ I und Typ III und reduzierte Expressionen von Mmp2 im Vergleich zu Wildtyp-Tieren gezeigt werden (Zhu *et al.*, 2013). Eine Inhibition von p53 könnte daher einen neuen Therapieeinsatz für die kardiale Fibrose-Entstehung nach einem Myokardinfarkt darstellen (Zhu *et al.*, 2013). Die Ursachen für die aufgetretenen Diskrepanzen in den beiden Publikationen wurden nicht weiter betrachtet. Die Herzfunktion der Schein-operierten als auch die der ligierten Tiere wurde für Wildtyp-Tiere und für heterozygote p53-Knockout-Tiere bestimmt (Matsusaka *et al.*, 2006). Die Herzfunktion verschlechterte sich in beiden Gruppen gleichermaßen nach der Ligation, aber die FS-Werte, als auch die linksventrikulären enddiastolischen und endsystolischen Durchmesser blieben für beide Genotypen nach der Schein-Operation gleich (Matsusaka *et al.*, 2006). Passend dazu konnte in beiden Gruppen die nicht ligiert wurden, keine Unterschiede in der Kollagen-Verteilung gezeigt werden (Zhu *et al.*, 2013).

Aufgrund der sehr kontroversen Bedeutung von p53 in der Entstehung der Fibrose ist es zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich, die entstandene Fibrose in Top2b-deletierten Tieren über eine erhöhte Bindung von p53 an profibrotischen Markern erklären zu können.

Würde von einer profibrotischen Bedeutung von p53 und von der Tatsache ausgegangen, dass die Aktivierung von p53 eine wichtige Ursache der DCM darstelle (Kodama *et al.*, 2011; Xiong *et al.*, 2007), könnte die entstandene Fibrose in Top2b-deletierten Tieren erstens durch eine Aktivierung von p53 und zweitens durch eine verstärkte Bindung von p53 an Promotorregionen profibrotischer Marker erklärt werden. Eine Aktivierung von p53 8 Wochen nach Implementierung der Top2b-Deletion müsste jedoch in einem weiteren Experiment noch gezeigt werden. Unterstützend dazu müsste in Zellkultur-Experimenten nach vorangehender Top2b-Deletion ebenfalls eine Aktivierung von p53 gezeigt werden. Eventuell könnten anschließende CHIP-Experimente eine p53-Bindung an Promotorbereichen von Colla1, Tgfb2 und Mmp2 bestätigen. Die Behandlung mit einem p53-Inhibitor wie Pifithrin (Dagher *et al.*, 2012) müsste dementsprechend antifibrotisch wirken.

Dass ein Interaktionsmechanismus zwischen der Top2b und p53 besteht, zeigte Cowell *et al.* bereits in Immunpräzipitations-Analysen und in Glutathion-S-Transferase Pull-down-Assays (Cowell *et al.*, 2000). Dieses Zusammenspiel beruht auf einer Interaktion der C-terminalen Domäne von Top2b mit der C-terminalen Domäne von p53 (Cowell *et al.*, 2000; Valkov and Sullivan, 2003). Ob jedoch p53 mit dem Top2b-Dimer als Tetramer agiert, als einzelnes Molekül oder sogar als Heteromer, wurde bislang nicht untersucht (Valkov and Sullivan, 2003). Vielmehr ruft die Interaktion der beiden Proteine eine Modulation der Aktivität von einem oder beiden Proteinen hervor (Cowell *et al.*, 2000), was eine p53-Aktivierung nach einer Top2b-Deletion erklären könnte.

#### 4.2.1.2 Die Aktivierung von p53 steht in Zusammenhang mit einer DOX-induzierten Top2b-Hemmung

Eine DOX-induzierte Herzschiidigung geht ebenfalls mit einer p53-Aktivierung einher (Vejpongsa and Yeh, 2014). 16 Stunden nach einer akuten DOX-Gabe konnten in isolierten Kardiomyozyten aus Top2b-Wildtyp-Tieren sowohl eine gesteigerte p53-Phosphorylierung, als auch erhiihte RNA-Expressionen von Genen (Apaf1, Bax, Fas) gezeigt werden, die in apoptotischen Signalwegen involviert sind (Zhang *et al.*, 2012; Hengartner, 2000). Nach einer DOX-Behandlung in H9C2-Kardiomyoblasten konnten ebenfalls erhiihte p53-Mengen in mitochondrialen Fraktionen nachgewiesen werden (Sardao *et al.*, 2009). Durch eine Vorbehandlung mit Pifithrin-alpha, einem p53-Inhibitor, konnte die DOX-induzierte Caspase-9 und Caspase-3 Aktivitit vollstindig verhindert und der DOX-induzierte Riickgang an Zellen wenn nicht total aber doch signifikant gestoppt werden (Sardao *et al.*, 2009).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Top2b essentiell zur Aufrechterhaltung der normalen Herzfunktions-Homiiostase ist. Gleichzeitig ist eine pharmakologische Hemmung der Top2b durch DOX und die daraus entstehenden DNA-Doppelstrangbriiche mit einer Herzschiidigung assoziiert (Lyu *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2012).

In diesem Zusammenhang kiihnte durch eine Behandlung mit Chemotherapeutika, die nur die TOP2A inhibieren, eine TOP2B-mediierte Herzschiidigung vermieden werden (Zhang *et al.*, 2012). Jedoch ist die Entwicklung spezifischer TOP2A-Inhibitoren aufgrund der hohen Sequenzhomologie der beiden Isoformen immer noch sehr schwierig (Shapiro and Austin, 2014). In Zuge dessen wird derzeit untersucht, ob der TOP2B-Level in peripheren Blutleukozyten als Surrogatmarker fiiur die Anthrazyklin-induzierte Kardiotoxizitit eingesetzt werden kann (Vejpongsa and Yeh, 2014). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Expression als auch die Enzymaktivitit von TOP2B in peripheren Blutleukozyten in einem Patientenkollektiv von 18 gesunden Probanden variierten und dass diese Variabilitit die Sensitivitit auf Anthrazykline und zum Teil die apoptotische Antwort auf DOX verandert hatten (Kersting *et al.*, 2006). So wurden signifikante Korrelationen zwischen dem TOP2B-Expressionslevel und dem Anteil an apoptotischen peripheren Leukozyten nach DOX-Gabe gesehen (Kersting *et al.*, 2006). Die variiierende TOP2B-Expression war sowohl auf Umwelteinfliiisse als auch auf genetische Polymorphismen zuriickzufiihren; die Autoren zeigten jedoch, dass die Polymorphismen primär in TOP2B-Regulatoren lokalisiert sind, da das TOP2B-Gen eine geringe genetische Variabilitit aufweist (Kersting *et al.*, 2006).

#### 4.2.1.3 Spielt eine nahrungsvermittelte Top2b-Inhibition eine Rolle in der Entstehung der Herzinsuffizienz?

Viele Lebensmittel beinhalten natürlich vorkommende TOP2-Inhibitoren (Deweese and Osheroff, 2009). Die hervortretende Gruppe an natürlichen Produkten die die Aktivität von TOP2-Enzymen beeinflussen kann, sind Bioflavonoide (z. B. Phytoestrogene) (Deweese and Osheroff, 2009; Strick *et al.*, 2000). Flavonoide (z.B. Genistein) sind weit verbreitete sekundäre Pflanzenstoffe und üblicherweise in Lebensmittel enthalten, die aus Pflanzen (z.B. aus Sojabohnen) gewonnen werden (Lopez-Lazaro *et al.*, 2007). Genistein wirkt u. a. als potentes TOP2-Gift (Bandelet and Osheroff, 2007). Es gibt Hinweise darauf, dass submikromolare Konzentrationen von Flavonoiden (wie z. B. Genistein), welche in pflanzlichen Lebensmitteln enthalten sind, eine Anti-Krebs-Wirkung entfalten können, welche Top-unabhängig (z. B. antioxidativ und antiestrogen) sind (Lopez-Lazaro *et al.*, 2007). Bei höheren mikromolaren nicht-zytotoxischen Konzentrationen induziert Genistein Top2b-vermittelte DNA-Schäden, die krebserzeugende Wirkungen erzeugen können; bei hohen zytotoxischen Konzentrationen können Genistein-haltige Nahrungsmittel durch die Induktion Top2b-vermittelter DNA-Schäden chemotherapeutische Effekte erzielen (Lopez-Lazaro *et al.*, 2007).

Eine Soja-haltige Nahrung besitzt einen potenten physiologischen Effekt der auf Isoflavone zurückzuführen ist, wobei Genistein und Daidzein die zwei wichtigsten Isoflavone in Soja darstellen (Stauffer *et al.*, 2006; Barnes, 2004). Soja-Proteine und Isoflavone haben im Hinblick auf ihre Funktion, Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen zu verbessern, große Aufmerksamkeit gewonnen (Sacks *et al.*, 2006); der kardiovaskuläre Gesundheitsgewinn einer ernährungsbedingten Soja-Zufuhr wird jedoch derzeit kontrovers diskutiert (Haines *et al.*, 2012).

So wurden in einem hypertrophischen Maus-Modell (HCM-Modell) sowohl in männlichen als auch in weiblichen 8 Monate alten Tieren die Effekte einer Soja-haltigen Nahrung im Vergleich zu einer Casein-Ernährung untersucht (Stauffer *et al.*, 2006). Männliche HCM-Tiere, die mit einer Soja-haltigen Nahrung gefüttert wurden, zeigten signifikant verschlechterte FS-Werte im Vergleich zu HCM-Tieren, die mit Casein gefüttert wurden. Neben funktionellen Verschlechterungen wurden signifikante Wandverdünnungen und Kammer-Dilatationen beobachtet. Parallel dazu konnten verstärkte fibrotische Ansammlungen in Soja-behandelten Tieren festgestellt werden, die zu einer kontraktilen Dysfunktion beigetragen hatten. In weiblichen HCM-Tieren konnten jedoch keine fibrotischen Veränderungen festgestellt werden. Neben funktionellen und fibrotischen Verschlechterungen konnte in männlichen HCM-Tieren, die mit Soja gefüttert wurden, sogar eine erhöhte Caspase-3 Aktivität gemessen werden. Die Autoren dieser Studie schlossen darauf, dass die Ernährung die kardiale Struktur und Funktion signifikant verändern kann, weshalb weitere Studien bezüglich eines Ernährungseffekts auf eine

Kardiomyopathie notwendig seien (Stauffer *et al.*, 2006). Die verschlechterte Herzfunktion in männlichen HCM-Tieren wurde durch die in Soja enthaltenen Phytoestrogene erklärt (Stauffer *et al.*, 2006).

Daraufhin wurden in Anschlussversuchen Tiere mit einer Phytoestrogen-freien Casein-basierten Nahrung gefüttert, die zusätzlich mit Genistein und Daidzein, den zwei häufigsten Phytoestrogenen in Soja angereichert wurde (Haines *et al.*, 2012). Auch hier entwickelten männliche HCM-Mäuse kardiale Dysfunktionen, die durch signifikant reduzierte FS-Werte und durch eine ventrikuläre Dilatation verbunden waren. Genexpressionsanalysen zeigten zudem erhöhte ANP-Expressionen, histologische Untersuchungen erhöhte Kollagenmengen und Fluoreszenzmessungen erhöhte Caspase-3 Aktivitäten. Diese Daten zeigten daher, dass die Haupt-Phytoestrogene in Soja, Genistein und Daidzein, verantwortlich für die verschlechterten kardialen Effekte einer Soja-haltigen Nahrung in männlichen HCM-Tieren sind (Haines *et al.*, 2012). Genistein fungiert u. a. als Tyrosin-Kinase Hemmer (Ming *et al.*, 2013) und eine Inhibition von Tyrosin-Kinasen geht mit einer Kardiotoxizität einher (Korashy *et al.*, 2014).

Vielleicht könnte eine Genistein-induzierte Kardiotoxizität nicht nur auf eine Inhibition von Tyrosin-Kinasen zurückzuführen sein, sondern auch auf eine Hemmung der Top2b, was das Ergebnis der hier vorliegenden Arbeit untermauern würde. Diese Hypothese müsste jedoch durch Anschlussuntersuchen untermauert werden. Zunächst könnte in Zellkulturversuchen eine Inhibition der Top2b durch Genistein bestätigt werden. Im Anschluss könnten mRNA-Expressionslevel von Genistein-behandelten Zellen untersucht werden. Ein Anstieg des ANP-Expressionslevels wäre in Bezug auf die Publikation von Haines *et al.* (Haines *et al.*, 2012) zu erwarten.

In diesem Zusammenhang könnte eventuell die steigende Prävalenz-Rate der Herzinsuffizienz (Braunwald, 2013a), trotz des therapeutischen Fortschrittes, durch eine Nahrungs-induzierte Herzschiädigung erklärt werden.

### 4.3 Die Rolle der Top2b in der Transkription

Die Top2b reguliert aufgrund ihrer Eigenschaft DNA-Doppelstrangbrüche zu induzieren die Transkription einiger eukaryotischer Genen und hat somit großen Einfluss auf die Aktivierung der Gentranskription (Ju *et al.*, 2006; Ju and Rosenfeld, 2006).

2 Wochen nach der TAM-induzierten Top2b-Deletion konnten in Top2b-deletierten Tieren 11 herunterregulierte Transkriptionsfaktoren detektiert werden. Mittels ChIP-qPCR und ChIP-seq wurde die Bindung von Top2b an Promotorbereiche (-500bp bis TSS (Lyu *et al.*,

2006)) der 11 herunterregulierten Transkriptionsfaktoren sowie die genomweite Bindung von Top2b an Wildtyp-Ganzherzhomogenaten untersucht.

Die Bindung von Top2b wurde bislang an Promotorregionen von Genen in Neuronen und in embryonalen Gehirnen gezeigt (Lyu *et al.*, 2006; Tiwari *et al.*, 2012). ChIP-Analysen demonstrierten eine direkte Interaktion und Bindung der Top2b an der 5'-UTR sowie upstream Regionen (bis -500bp) an einer Vielzahl von Top2b-sensitiven Genen, was auf eine direkte Rolle der Top2b in die Transkription dieser Gene hindeuten könnte (Lyu *et al.*, 2006). Jedoch konnte in Promotorregionen einiger anderer Top2b-sensitiver Gene hingegen keine Bindung festgestellt werden. Vielleicht besitzt die Top2b eine indirekte Rolle in der Transkription dieser Gene oder die Top2b-Bindung liegt in einem anderen Bereich, entfernt des untersuchten Bereiches (Lyu *et al.*, 2006); eine andere Möglichkeit könnte auch die Involvierung der Top2b nicht nur in der Initiation sondern auch in der Transkriptions-Elongation darstellen (Lyu *et al.*, 2006).

Das Vorhandensein einer Top2b-Bindung im Herzen ist jedoch bislang unklar. Es gibt zwar verschiedene Protokolle zur Durchführung der ChIP-Methode an isolierten Kardiomyozyten (Bolli *et al.*, 2013) und am enzymatisch verdauten Herzen (Pinto *et al.*, 2013), aber unter der Verwendung eines Top2b-Antikörpers sind lediglich ChIP-chip Experimente bekannt (Tiwari *et al.*, 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde für die ChIP-qPCR und ChIP-seq der Top2b-Antikörper von Santa Cruz verwendet, der 2012 in ChIP-chip Experimenten eingesetzt wurde (Tiwari *et al.*, 2012). Ein anderer Top2b-Antikörper wurde ebenfalls ausgetestet (Wartlick *et al.*, 2013), wohingegen der Top2b-Antikörper aus Tiwari *et al.* eine erhöhte Spezifität aufwies (Daten nicht gezeigt).

In den ChIP-Untersuchungen konnte keine Top2b-Bindung an Promotorbereichen der Transkriptionsfaktoren detektiert werden. Gleichzeitig konnte mit einer bevorzugten Bindung der Top2b in Intronbereichen 200-300bp downstream der TSS kein direkter Einfluss auf basale Promotoren festgestellt werden. Tiwari *et al.* zeigte dagegen eine bevorzugte Top2b-Bindung am Promotor im Vergleich zu Exonen, Introns und Intergenregionen (Tiwari *et al.*, 2012). Außerdem ist die Bindung der Top2b mit einer Entfernung von 10-100kb zum nächstliegenden Gen zu weit entfernt, um von einem direkten Effekt auf den Promotor auszugehen. 9 Gene aus Replik 1, an denen die Top2b in der ChIP-seq am höchsten gebunden hat, wurden mittels ChIP-qPCR untersucht. Nur 3 der 9 ausgewählten Gene *Arl15*, *Inpp5f* und *Egf* konnten mit dem Herzen und einer Herzinsuffizienz in Verbindung gebracht werden. *Arl15* ist sehr stark in Skelettmuskeln exprimiert und beeinflusst zirkulierende Adiponektin-Level (Richards *et al.*, 2009). Außerdem wird ein Einfluss auf das koronare Herzerkrankungsrisiko postuliert (Richards *et al.*, 2009). *Inpp5f* ist als anti-hypertrophisches Gen ein negativer Regulator der kardialen Hypertrophie (Kee and Kook, 2011; Zhu *et al.*, 2009). *Inpp5f*-Knockout Mäuse zeigten

nach einem Stress-Stimulus eine erhöhte Hypertrophie-Rate im Vergleich zu Inpp5f-tragenden Tieren (Zhu *et al.*, 2009). Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor Egf-R wird ebenfalls in Verbindung mit der Entstehung einer kardialen Hypertrophie gebracht (Anderson *et al.*, 2004). Da die Top2b in diesen Genen jedoch auch in Intronbereichen gebunden hatte, ist auch hier kein Transkriptionseffekt zu erwarten.

In der vorliegenden Arbeit konnte keine Bindung der Top2b an Promotorbereiche von Transkriptionsfaktoren und anderen Genen gezeigt werden, was aber nicht dem generellen Fehlen einer Bindung gleichkommen muss. Vielmehr gab es methodische Schwierigkeiten (wie die Wahl des korrekten Antikörpers oder einer wohlmöglich fehlenden Top2b-Bindung im Herzen), weshalb die Bedeutung der Top2b in die Transkription nicht ausreichend geklärt werden konnte. Gleichmaßen könnte eine wie bei Lyu *et al.* beschriebene indirekte Verknüpfung zwischen der Deletion der Top2b und der Herunterregulierung der Transkriptionsfaktoren vorliegen (Lyu *et al.*, 2006), die mit der verwendeten CHIP-Methode ebenfalls nicht zu erfassen wäre.



## 5. Literaturverzeichnis

- Abelmann, W. H. (1984) Classification and natural history of primary myocardial disease. *Progress in cardiovascular diseases*, 27, 73-94.
- Aliti, G. B., Rabelo, E. R., Clausell, N., Rohde, L. E., Biolo, A. and Beck-da-Silva, L. (2013) Aggressive fluid and sodium restriction in acute decompensated heart failure: a randomized clinical trial. *JAMA internal medicine*, 173, 1058-1064.
- Amundsen, B. H., Ericsson, M., Seland, J. G., Pavlin, T., Ellingsen, O. and Brekken, C. (2011) A comparison of retrospectively self-gated magnetic resonance imaging and high-frequency echocardiography for characterization of left ventricular function in mice. *Laboratory animals*, 45, 31-37.
- Anderson, H. D., Wang, F. and Gardner, D. G. (2004) Role of the epidermal growth factor receptor in signaling strain-dependent activation of the brain natriuretic peptide gene. *The Journal of biological chemistry*, 279, 9287-9297.
- Andersson, K. B., Winer, L. H., Mork, H. K., Molkenin, J. D. and Jaisser, F. (2010) Tamoxifen administration routes and dosage for inducible Cre-mediated gene disruption in mouse hearts. *Transgenic research*, 19, 715-725.
- Angermann, C. E. and Ertl, G. (2004) [Natriuretic peptides--new diagnostic markers in heart disease]. *Herz*, 29, 609-617.
- Austin, C. A. and Marsh, K. L. (1998) Eukaryotic DNA topoisomerase II beta. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 20, 215-226.
- Bandelet, O. J. and Osheroff, N. (2007) Bioflavonoids as poisons of human topoisomerase II alpha and II beta. *Biochemistry*, 46, 6097-6108.
- Barnes, S. (2004) Soy isoflavones--phytoestrogens and what else? *The Journal of nutrition*, 134, 1225S-1228S.
- Berger, J. M., Gamblin, S. J., Harrison, S. C. and Wang, J. C. (1996) Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature*, 379, 225-232.
- Berk, B. C., Fujiwara, K. and Lehoux, S. (2007) ECM remodeling in hypertensive heart disease. *The Journal of clinical investigation*, 117, 568-575.
- Bishop, J. E., Greenbaum, R., Gibson, D. G., Yacoub, M. and Laurent, G. J. (1990) Enhanced deposition of predominantly type I collagen in myocardial disease. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 22, 1157-1165.
- Bolli, P., Vardabasso, C., Bernstein, E. and Chaudhry, H. W. (2013) Chromatin immunoprecipitation of adult murine cardiomyocytes. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.], Chapter 17, Unit 17.14*.
- Border, W. A. and Noble, N. A. (1994) Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *The New England journal of medicine*, 331, 1286-1292.
- Border, W. A. and Ruoslahti, E. (1992) Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *The Journal of clinical investigation*, 90, 1-7.
- Brady, C. A. and Attardi, L. D. (2010) p53 at a glance. *Journal of cell science*, 123, 2527-2532.
- Braunwald, E. (2013a) Heart Failure. *JACC. Heart failure*, 1, 1-20.
- Braunwald, E. (2013b) Heart failure: an update. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 94, 430-432.
- Breckenridge, R. (2010) Heart failure and mouse models. *Disease models & mechanisms*, 3, 138-143.
- Brooks, C. L. and Gu, W. (2010) New insights into p53 activation. *Cell research*, 20, 614-621.
- Brooks, W. W. and Conrad, C. H. (2000) Myocardial fibrosis in transforming growth factor beta(1)heterozygous mice. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 32, 187-195.
- Brown, R. D., Ambler, S. K., Mitchell, M. D. and Long, C. S. (2005) The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 45, 657-687.

- Capranico, G., Tinelli, S., Austin, C. A., Fisher, M. L. and Zunino, F. (1992) Different patterns of gene expression of topoisomerase II isoforms in differentiated tissues during murine development. *Biochimica et biophysica acta*, 1132, 43-48.
- Castro, M. M., Cena, J., Cho, W. J., Walsh, M. P. and Schulz, R. (2012) Matrix metalloproteinase-2 proteolysis of calponin-1 contributes to vascular hypocontractility in endotoxemic rats. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32, 662-668.
- Champoux, J. J. (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual review of biochemistry*, 70, 369-413.
- Chen, J. and Chien, K. R. (1999) Complexity in simplicity: monogenic disorders and complex cardiomyopathies. *The Journal of clinical investigation*, 103, 1483-1485.
- Chen, J. F., Murchison, E. P., Tang, R., Callis, T. E., Tatsuguchi, M., Deng, Z., Rojas, M., Hammond, S. M., Schneider, M. D., Selzman, C. H., Meissner, G., Patterson, C., Hannon, G. J. and Wang, D. Z. (2008) Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 2111-2116.
- Cohn, J. N., Ferrari, R. and Sharpe, N. (2000) Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*, 35, 569-582.
- Collins, I., Weber, A. and Levens, D. (2001) Transcriptional consequences of topoisomerase inhibition. *Molecular and cellular biology*, 21, 8437-8451.
- Cowell, I. G., Okorokov, A. L., Cutts, S. A., Padget, K., Bell, M., Milner, J. and Austin, C. A. (2000) Human topoisomerase IIalpha and IIbeta interact with the C-terminal region of p53. *Experimental cell research*, 255, 86-94.
- Dagher, P. C., Mai, E. M., Hato, T., Lee, S. Y., Anderson, M. D., Karozos, S. C., Mang, H. E., Knipe, N. L., Plotkin, Z. and Sutton, T. A. (2012) The p53 inhibitor pifithrin-alpha can stimulate fibrosis in a rat model of ischemic acute kidney injury. *American journal of physiology. Renal physiology*, 302, F284-291.
- Dahl, J. A. and Collas, P. (2008) A rapid micro chromatin immunoprecipitation assay (microChIP). *Nature protocols*, 3, 1032-1045.
- Davidson, J. Einführung in die Internationale Nomenklatur, Charles River.  
<http://www.medizin.uni-tuebingen.de/tierschutz/Einfuehrung-Internationale-Nomenklatur.pdf>.
- Davis, J., Maillet, M., Miano, J. M. and Molkentin, J. D. (2012) Lost in transgenesis: a user's guide for genetically manipulating the mouse in cardiac research. *Circulation research*, 111, 761-777.
- Dawson, D., Lygate, C. A., Saunders, J., Schneider, J. E., Ye, X., Hulbert, K., Noble, J. A. and Neubauer, S. (2004) Quantitative 3-dimensional echocardiography for accurate and rapid cardiac phenotype characterization in mice. *Circulation*, 110, 1632-1637.
- Deweese, J. E. and Osheroff, N. (2009) The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. *Nucleic acids research*, 37, 738-748.
- Dobaczewski, M., Chen, W. and Frangogiannis, N. G. (2011) Transforming growth factor (TGF)-beta signaling in cardiac remodeling. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 51, 600-606.
- Eckhouse, S. R. and Spinale, F. G. (2012) Changes in the myocardial interstitium and contribution to the progression of heart failure. *Heart failure clinics*, 8, 7-20.
- Emanuelli, C., Maestri, R., Corradi, D., Marchione, R., Minasi, A., Tozzi, M. G., Salis, M. B., Straino, S., Capogrossi, M. C., Olivetti, G. and Madeddu, P. (1999) Dilated and failing cardiomyopathy in bradykinin B(2) receptor knockout mice. *Circulation*, 100, 2359-2365.
- Falk, T., Jonsson, L., Olsen, L. H., Tarnow, I. and Pedersen, H. D. (2010) Associations between cardiac pathology and clinical, echocardiographic and electrocardiographic findings in dogs with chronic congestive heart failure. *Veterinary journal*, 185, 68-74.
- Feng, J., Liu, T., Qin, B., Zhang, Y. and Liu, X. S. (2012) Identifying ChIP-seq enrichment using MACS. *Nature protocols*, 7, 1728-1740.

- Fischer, M. D., Goldmann, T., Wallrapp, C., Mühlfriedel, R., Beck, S. C., Stern-Schneider, G., Ueffing, M., Wolfrum, U. and Seeliger, M. W. (2013) Successful Subretinal Delivery and Monitoring of MicroBeads in Mice. *PLoS one*, 8, e55173.
- Gewirtz, D. A. (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical pharmacology*, 57, 727-741.
- Ghosh, A. K., Bhattacharyya, S. and Varga, J. (2004) The tumor suppressor p53 abrogates Smad-dependent collagen gene induction in mesenchymal cells. *The Journal of biological chemistry*, 279, 47455-47463.
- Ghosh, A. K., Quaggin, S. E. and Vaughan, D. E. (2013) Molecular basis of organ fibrosis: potential therapeutic approaches. *Experimental biology and medicine*, 238, 461-481.
- Ghosh, K. and Van Duyne, G. D. (2002) Cre-loxP biochemistry. *Methods*, 28, 374-383.
- Haines, C. D., Harvey, P. A., Luczak, E. D., Barthel, K. K., Konhilas, J. P., Watson, P. A., Stauffer, B. L. and Leinwand, L. A. (2012) Estrogenic compounds are not always cardioprotective and can be lethal in males with genetic heart disease. *Endocrinology*, 153, 4470-4479.
- Hall, M. E., Smith, G., Hall, J. E. and Stec, D. E. (2011) Systolic dysfunction in cardiac-specific ligand-inducible MerCreMer transgenic mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 301, H253-260.
- Hayashi, S. and McMahon, A. P. (2002) Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Developmental biology*, 244, 305-318.
- Hengartner, M. O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, 770-776.
- Hess (2003) Herzinsuffizienz: Definition, Ursachen und Formen Schweiz Med Forum, Nr.48, 26.November 2003.
- Hoppe, U. C., Böhm, M., Dietz, R., Hanrath, P., Kroemer, H. K., Osterspey, A., Schmaltz, A. A., Erdmann, E. and Vorstand der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie--Herz- und Kreislaufforschung e. V. (2005) [Guidelines for therapy of chronic heart failure]. *Zeitschrift für Kardiologie*, 94, 488-509.
- Hossain, M. M., Hwang, D. Y., Huang, Q. Q., Sasaki, Y. and Jin, J. P. (2003) Developmentally regulated expression of calponin isoforms and the effect of h2-calponin on cell proliferation. *American journal of physiology. Cell physiology*, 284, C156-167.
- Hougen, K., Aronsen, J. M., Stokke, M. K., Enger, U., Nygård, S., Andersson, K. B., Christensen, G., Sejersted, O. M. and Sjaastad, I. (2010) Cre-loxP DNA recombination is possible with only minimal unspecific transcriptional changes and without cardiomyopathy in Tg ( $\alpha$ MHC-MerCreMer) mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 299, H1671-H1678.
- Hunt, S. A., Abraham, W. T., Chin, M. H., Feldman, A. M., Francis, G. S., Ganiats, T. G., Jessup, M., Konstam, M. A., Mancini, D. M., Michl, K., Oates, J. A., Rahko, P. S., Silver, M. A., Stevenson, L. W., Yancy, C. W., American College of Cardiology, F. and American Heart, A. (2009) 2009 Focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Journal of the American College of Cardiology*, 53, e1-e90.
- Iwasaki, K., Kojima, K., Kodama, S., Paz, A. C., Chambers, M., Umezu, M. and Vacanti, C. A. (2008) Bioengineered three-layered robust and elastic artery using hemodynamically-equivalent pulsatile bioreactor. *Circulation*, 118, S52-57.
- Janicki, J. S. and Brower, G. L. (2002) The role of myocardial fibrillar collagen in ventricular remodeling and function. *Journal of cardiac failure*, 8, S319-325.
- Ju, B. G., Lunyak, V. V., Perissi, V., Garcia-Bassets, I., Rose, D. W., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. (2006) A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science*, 312, 1798-1802.
- Ju, B. G. and Rosenfeld, M. G. (2006) A breaking strategy for topoisomerase IIbeta/PARP-1-dependent regulated transcription. *Cell cycle*, 5, 2557-2560.

- Juenke, J. M. and Holden, J. A. (1993) The distribution of DNA topoisomerase II isoforms in differentiated adult mouse tissues. *Biochimica et biophysica acta*, 1216, 191-196.
- Kawano, S., Miyaji, M., Ichiyasu, S., Tsutsui, K. M. and Tsutsui, K. (2010) Regulation of DNA Topoisomerase IIbeta through RNA-dependent association with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (hnRNP U). *The Journal of biological chemistry*, 285, 26451-26460.
- Kee, H. J. and Kook, H. (2011) Roles and targets of class I and IIa histone deacetylases in cardiac hypertrophy. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, 928326.
- Kenzelmann Broz, D., Spano Mello, S., Biegling, K. T., Jiang, D., Dusek, R. L., Brady, C. A., Sidow, A. and Attardi, L. D. (2013) Global genomic profiling reveals an extensive p53-regulated autophagy program contributing to key p53 responses. *Genes & development*, 27, 1016-1031.
- Kersting, G., Tzvetkov, M. V., Huse, K., Kulle, B., Hafner, V., Brockmoller, J. and Wojnowski, L. (2006) Topoisomerase II beta expression level correlates with doxorubicin-induced apoptosis in peripheral blood cells. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 374, 21-30.
- Kodama, T., Takehara, T., Hikita, H., Shimizu, S., Shigekawa, M., Tsunematsu, H., Li, W., Miyagi, T., Hosui, A., Tatsumi, T., Ishida, H., Kanto, T., Hiramatsu, N., Kubota, S., Takigawa, M., Tomimaru, Y., Tomokuni, A., Nagano, H., Doki, Y., Mori, M. and Hayashi, N. (2011) Increases in p53 expression induce CTGF synthesis by mouse and human hepatocytes and result in liver fibrosis in mice. *The Journal of clinical investigation*, 121, 3343-3356.
- Koitabashi, N., Bedja, D., Zaiman, A. L., Pinto, Y. M., Zhang, M., Gabrielson, K. L., Takimoto, E. and Kass, D. A. (2009) Avoidance of transient cardiomyopathy in cardiomyocyte-targeted tamoxifen-induced MerCreMer gene deletion models. *Circulation research*, 105, 12-15.
- Kong, P., Christia, P. and Frangogiannis, N. G. (2013) The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*.
- Konig, S., Nitzki, F., Uhmman, A., Dittmann, K., Theiss-Suennemann, J., Herrmann, M., Reichardt, H. M., Schwendener, R., Pukrop, T., Schulz-Schaeffer, W. and Hahn, H. (2014) Depletion of cutaneous macrophages and dendritic cells promotes growth of basal cell carcinoma in mice. *PloS one*, 9, e93555.
- Korashy, H. M., Al-Suwayeh, H. A., Maayah, Z. H., Ansari, M. A., Ahmad, S. F. and Bakheet, S. A. (2014) Mitogen-Activated Protein Kinases Pathways Mediate the Sunitinib-Induced Hypertrophy in Rat Cardiomyocyte H9c2 Cells. *Cardiovascular toxicology*.
- Kos, C. H. (2004) Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models. *Nutrition reviews*, 62, 243-246.
- Kremer, L. C., van Dalen, E. C., Offringa, M. and Voute, P. A. (2002) Frequency and risk factors of anthracycline-induced clinical heart failure in children: a systematic review. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 13, 503-512.
- Lane, D. P. (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358, 15-16.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. and Salzberg, S. L. (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology*, 10, R25.
- Lee, T. I., Johnstone, S. E. and Young, R. A. (2006) Chromatin immunoprecipitation and microarray-based analysis of protein location. *Nature protocols*, 1, 729-748.
- Lefta, M., Campbell, K. S., Feng, H. Z., Jin, J. P. and Esser, K. A. (2012) Development of dilated cardiomyopathy in Bmal1-deficient mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 303, H475-485.
- Lexow, J., Poggioli, T., Sarathchandra, P., Santini, M. P. and Rosenthal, N. (2013) Cardiac fibrosis in mice expressing an inducible myocardial-specific Cre driver. *Disease models & mechanisms*, 6, 1470-1476.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods*, 25, 402-408.

- Lopez-Lazaro, M., Willmore, E. and Austin, C. A. (2007) Cells lacking DNA topoisomerase II beta are resistant to genistein. *Journal of natural products*, 70, 763-767.
- Lu, D., Zhang, L., Bao, D., Lu, Y., Zhang, X., Liu, N., Ge, W., Gao, X., Li, H. and Zhang, L. (2014) Calponin1 inhibits dilated cardiomyopathy development in mice through the epsilonPKC pathway. *International journal of cardiology*, 173, 146-153.
- Lymperopoulos, A. (2013) Physiology and pharmacology of the cardiovascular adrenergic system. *Frontiers in physiology*, 4.
- Lyu, Y. L., Kerrigan, J. E., Lin, C. P., Azarova, A. M., Tsai, Y. C., Ban, Y. and Liu, L. F. (2007) Topoisomerase II beta-Mediated DNA double-strand breaks: Implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer Res*, 67, 8839-8846.
- Lyu, Y. L., Lin, C. P., Azarova, A. M., Cai, L., Wang, J. C. and Liu, L. F. (2006) Role of topoisomerase IIbeta in the expression of developmentally regulated genes. *Molecular and cellular biology*, 26, 7929-7941.
- Lyu, Y. L. and Wang, J. C. (2003) Aberrant lamination in the cerebral cortex of mouse embryos lacking DNA topoisomerase IIbeta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 7123-7128.
- Maeda, K., Tsutamoto, T., Wada, A., Hisanaga, T. and Kinoshita, M. (1998) Plasma brain natriuretic peptide as a biochemical marker of high left ventricular end-diastolic pressure in patients with symptomatic left ventricular dysfunction. *American heart journal*, 135, 825-832.
- Maisel, A. S., McCord, J., Nowak, R. M., Hollander, J. E., Wu, A. H., Duc, P., Omland, T., Storrow, A. B., Krishnaswamy, P., Abraham, W. T., Clopton, P., Steg, G., Aumont, M. C., Westheim, A., Knudsen, C. W., Perez, A., Kamin, R., Kazanegra, R., Herrmann, H. C., McCullough, P. A. and Breathing Not Properly Multinational Study, I. (2003) Bedside B-Type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure with reduced or preserved ejection fraction. Results from the Breathing Not Properly Multinational Study. *Journal of the American College of Cardiology*, 41, 2010-2017.
- Mali Salmon-Divon, R. L., Myrto Kostadima (2012) ChIP-seq practical: peak detection and peak annotation.
- Mall, G., Huther, W., Schneider, J., Lundin, P. and Ritz, E. (1990) Diffuse intermyocardiocytic fibrosis in uraemic patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 5, 39-44.
- Manabe, I., Shindo, T. and Nagai, R. (2002) Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circulation research*, 91, 1103-1113.
- Markel, P., Shu, P., Ebeling, C., Carlson, G. A., Nagle, D. L., Smutko, J. S. and Moore, K. J. (1997) Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nature genetics*, 17, 280-284.
- Matsusaka, H., Ide, T., Matsushima, S., Ikeuchi, M., Kubota, T., Sunagawa, K., Kinugawa, S. and Tsutsui, H. (2006) Targeted deletion of p53 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res*, 70, 457-465.
- McConnell, B. K., Jones, K. A., Fatkin, D., Arroyo, L. H., Lee, R. T., Aristizabal, O., Turnbull, D. H., Georgakopoulos, D., Kass, D., Bond, M., Niimura, H., Schoen, F. J., Conner, D., Fischman, D. A., Seidman, C. E. and Seidman, J. G. (1999) Dilated cardiomyopathy in homozygous myosin-binding protein-C mutant mice. *The Journal of clinical investigation*, 104, 1235-1244.
- McMurray, J. J., Adamopoulos, S., Anker, S. D., Auricchio, A., Böhm, M., Dickstein, K., Falk, V., Filippatos, G., Fonseca, C. and Gomez-Sanchez, M. A. (2012) 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. *European heart journal*, 33, 1787-1847.
- McMurray, J. J. and Stewart, S. (2000) Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart*, 83, 596-602.

- Ming, L. G., Chen, K. M. and Xian, C. J. (2013) Functions and action mechanisms of flavonoids genistein and icariin in regulating bone remodeling. *Journal of cellular physiology*, 228, 513-521.
- Mosterd, A. and Hoes, A. W. (2007) Clinical epidemiology of heart failure. *Heart*, 93, 1137-1146.
- Nakai, A., Yamaguchi, O., Takeda, T., Higuchi, Y., Hikoso, S., Taniike, M., Omiya, S., Mizote, I., Matsumura, Y., Asahi, M., Nishida, K., Hori, M., Mizushima, N. and Otsu, K. (2007) The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nature medicine*, 13, 619-624.
- Nishimura, H., Okazaki, T., Tanaka, Y., Nakatani, K., Hara, M., Matsumori, A., Sasayama, S., Mizoguchi, A., Hiai, H., Minato, N. and Honjo, T. (2001) Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science*, 291, 319-322.
- Nitiss, J. L. (2009) DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nature reviews. Cancer*, 9, 327-337.
- Oka, T., Xu, J., Kaiser, R. A., Melendez, J., Hambleton, M., Sargent, M. A., Lorts, A., Brunskill, E. W., Dorn, G. W., 2nd, Conway, S. J., Aronow, B. J., Robbins, J. and Molkentin, J. D. (2007) Genetic manipulation of periostin expression reveals a role in cardiac hypertrophy and ventricular remodeling. *Circulation research*, 101, 313-321.
- Oliver, P. M., Fox, J. E., Kim, R., Rockman, H. A., Kim, H. S., Reddick, R. L., Pandey, K. N., Milgram, S. L., Smithies, O. and Maeda, N. (1997) Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 14730-14735.
- Oren, M. and Rotter, V. (1999) Introduction: p53--the first twenty years. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 55, 9-11.
- Pauschinger, M., Knopf, D., Petschauer, S., Doerner, A., Poller, W., Schwimmbeck, P. L., Kuhl, U. and Schultheiss, H. P. (1999) Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation*, 99, 2750-2756.
- Pinto, A. R., Chandran, A., Rosenthal, N. A. and Godwin, J. W. (2013) Isolation and analysis of single cells from the mouse heart. *Journal of immunological methods*, 393, 74-80.
- Reifenberg, K., Lehr, H. A., Torzewski, M., Steige, G., Wiese, E., Kupper, I., Becker, C., Ott, S., Nusser, P., Yamamura, K., Rechtsteiner, G., Warger, T., Pautz, A., Kleinert, H., Schmidt, A., Pieske, B., Wenzel, P., Munzel, T. and Lohler, J. (2007) Interferon-gamma induces chronic active myocarditis and cardiomyopathy in transgenic mice. *The American journal of pathology*, 171, 463-472.
- Richards, J. B., Waterworth, D., O'Rahilly, S., Hivert, M. F., Loos, R. J., Perry, J. R., Tanaka, T., Timpson, N. J., Semple, R. K., Soranzo, N., Song, K., Rocha, N., Grundberg, E., Dupuis, J., Florez, J. C., Langenberg, C., Prokopenko, I., Saxena, R., Sladek, R., Aulchenko, Y., Evans, D., Waeber, G., Erdmann, J., Burnett, M. S., Sattar, N., Devaney, J., Willenborg, C., Hingorani, A., Witteman, J. C., Vollenweider, P., Glaser, B., Hengstenberg, C., Ferrucci, L., Melzer, D., Stark, K., Deanfield, J., Winogradow, J., Grassl, M., Hall, A. S., Egan, J. M., Thompson, J. R., Ricketts, S. L., Konig, I. R., Reinhard, W., Grundy, S., Wichmann, H. E., Barter, P., Mahley, R., Kesaniemi, Y. A., Rader, D. J., Reilly, M. P., Epstein, S. E., Stewart, A. F., Van Duijn, C. M., Schunkert, H., Burling, K., Deloukas, P., Pastinen, T., Samani, N. J., McPherson, R., Davey Smith, G., Frayling, T. M., Wareham, N. J., Meigs, J. B., Mooser, V., Spector, T. D. and Consortium, G. (2009) A genome-wide association study reveals variants in ARL15 that influence adiponectin levels. *PLoS genetics*, 5, e1000768.
- Richardson, P., McKenna, W., Bristow, M., Maisch, B., Mautner, B., O'Connell, J., Olsen, E., Thiene, G., Goodwin, J., Gyarsfas, I., Martin, I. and Nordet, P. (1996) Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation*, 93, 841-842.
- Rigolli, M. and Whalley, G. A. (2013) Heart failure with preserved ejection fraction. *Journal of geriatric cardiology : JGC*, 10, 369-376.

- Ritzenthaler, J. D., Goldstein, R. H., Fine, A., Lichtler, A., Rowe, D. W. and Smith, B. D. (1991) Transforming-growth-factor-beta activation elements in the distal promoter regions of the rat alpha 1 type I collagen gene. *The Biochemical journal*, 280 ( Pt 1), 157-162.
- Robinson, J. T., Thorvaldsdottir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G. and Mesirov, J. P. (2011) Integrative genomics viewer. *Nature biotechnology*, 29, 24-26.
- Roger, V. L. (2013) Epidemiology of heart failure. *Circulation research*, 113, 646-659.
- Ruskoaho, H. (2003) Cardiac hormones as diagnostic tools in heart failure. *Endocrine reviews*, 24, 341-356.
- Sacks, F. M., Lichtenstein, A., Van Horn, L., Harris, W., Kris-Etherton, P. and Winston, M. (2006) Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health: a summary of a statement for professionals from the american heart association nutrition committee. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 26, 1689-1692.
- Sakaguchi, K., Herrera, J. E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C. W. and Appella, E. (1998) DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes & development*, 12, 2831-2841.
- Salmon-Divon, M., Dvinge, H., Tammoja, K. and Bertone, P. (2010) PeakAnalyzer: genome-wide annotation of chromatin binding and modification loci. *BMC bioinformatics*, 11, 415.
- Sardao, V. A., Oliveira, P. J., Holy, J., Oliveira, C. R. and Wallace, K. B. (2009) Doxorubicin-induced mitochondrial dysfunction is secondary to nuclear p53 activation in H9c2 cardiomyoblasts. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 64, 811-827.
- Schips, T. G., Wietelmann, A., Hohn, K., Schimanski, S., Walther, P., Braun, T., Wirth, T. and Maier, H. J. (2011a) FoxO3 induces reversible cardiac atrophy and autophagy in a transgenic mouse model. *Cardiovasc Res*, 91, 587-597.
- Schips, T. G., Wietelmann, A., Höhn, K., Schimanski, S., Walther, P., Braun, T., Wirth, T. and Maier, H. J. (2011b) FoxO3 induces reversible cardiac atrophy and autophagy in a transgenic mouse model. *Cardiovascular research*, 91, 587-597.
- Schmidt, D., Wilson, M. D., Spyrou, C., Brown, G. D., Hadfield, J. and Odom, D. T. (2009) ChIP-seq: using high-throughput sequencing to discover protein-DNA interactions. *Methods*, 48, 240-248.
- Seeland, U., Haeuseler, C., Hinrichs, R., Rosenkranz, S., Pfitzner, T., Scharffetter-Kochanek, K. and Böhm, M. (2002) Myocardial fibrosis in transforming growth factor-beta(1) (TGF-beta(1)) transgenic mice is associated with inhibition of interstitial collagenase. *European journal of clinical investigation*, 32, 295-303.
- Shapiro, A. B. and Austin, C. A. (2014) A high-throughput fluorescence anisotropy-based assay for human topoisomerase II beta-catalyzed ATP-dependent supercoiled DNA relaxation. *Analytical biochemistry*, 448, 23-29.
- Sivakumar, P., Gupta, S., Sarkar, S. and Sen, S. (2008) Upregulation of lysyl oxidase and MMPs during cardiac remodeling in human dilated cardiomyopathy. *Molecular and cellular biochemistry*, 307, 159-167.
- Sohal, D. S., Nghiem, M., Crackower, M. A., Witt, S. A., Kimball, T. R., Tymitz, K. M., Penninger, J. M. and Molkenin, J. D. (2001) Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circulation research*, 89, 20-25.
- Stauffer, B. L., Konhilas, J. P., Luczak, E. D. and Leinwand, L. A. (2006) Soy diet worsens heart disease in mice. *The Journal of clinical investigation*, 116, 209-216.
- Stein, A. B., Jones, T. A., Herron, T. J., Patel, S. R., Day, S. M., Noujaim, S. F., Milstein, M. L., Klos, M., Furspan, P. B., Jalife, J. and Dressler, G. R. (2011) Loss of H3K4 methylation destabilizes gene expression patterns and physiological functions in adult murine cardiomyocytes. *The Journal of clinical investigation*, 121, 2641-2650.
- Stein, B. C. and Levin, R. I. (1998) Natriuretic peptides: physiology, therapeutic potential, and risk stratification in ischemic heart disease. *American heart journal*, 135, 914-923.
- Strick, R., Strissel, P. L., Borgers, S., Smith, S. L. and Rowley, J. D. (2000) Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant

- leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 4790-4795.
- Stuckey, D. J., Carr, C. A., Tyler, D. J. and Clarke, K. (2008) Cine-MRI versus two-dimensional echocardiography to measure in vivo left ventricular function in rat heart. *NMR in biomedicine*, 21, 765-772.
- Stypmann, J., Glaser, K., Roth, W., Tobin, D. J., Petermann, I., Matthias, R., Monnig, G., Haverkamp, W., Breithardt, G., Schmahl, W., Peters, C. and Reinheckel, T. (2002) Dilated cardiomyopathy in mice deficient for the lysosomal cysteine peptidase cathepsin L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 6234-6239.
- Tamura, N., Ogawa, Y., Chusho, H., Nakamura, K., Nakao, K., Suda, M., Kasahara, M., Hashimoto, R., Katsuura, G., Mukoyama, M., Itoh, H., Saito, Y., Tanaka, I., Otani, H. and Katsuki, M. (2000) Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 4239-4244.
- Tan, F. L., Moravec, C. S., Li, J., Apperson-Hansen, C., McCarthy, P. M., Young, J. B. and Bond, M. (2002) The gene expression fingerprint of human heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 11387-11392.
- Tannour-Louet, M., Porteu, A., Vaulont, S., Kahn, A. and Vasseur-Cognet, M. (2002) A tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase specifically effective in the fetal and adult mouse liver. *Hepatology*, 35, 1072-1081.
- Thorvaldsdottir, H., Robinson, J. T. and Mesirov, J. P. (2013) Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in bioinformatics*, 14, 178-192.
- Tiwari, V. K., Burger, L., Nikolettou, V., Deogracias, R., Thakurela, S., Wirbelauer, C., Kaut, J., Terranova, R., Hoerner, L., Mielke, C., Boege, F., Murr, R., Peters, A. H., Barde, Y. A. and Schubeler, D. (2012) Target genes of Topoisomerase IIbeta regulate neuronal survival and are defined by their chromatin state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, E934-943.
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., Pimentel, H., Salzberg, S. L., Rinn, J. L. and Pachter, L. (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols*, 7, 562-578.
- Truett, G. E., Heeger, P., Mynatt, R. L., Truett, A. A., Walker, J. A. and Warman, M. L. (2000) Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *BioTechniques*, 29, 52, 54.
- Valkov, N. I. and Sullivan, D. M. (2003) Tumor p53 status and response to topoisomerase II inhibitors. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 6, 27-39.
- Van Dalen, E., Caron, H., Dickinson, H. and Kremer, L. (2011) Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines. status and date: New search for studies and content updated (conclusions changed), published in.
- van Dalen, E. C., van der Pal, H. J., Kok, W. E., Caron, H. N. and Kremer, L. C. (2006) Clinical heart failure in a cohort of children treated with anthracyclines: a long-term follow-up study. *European journal of cancer*, 42, 3191-3198.
- van Hoven, K. H. and Factor, S. M. (1990) A comparison of the pathological spectrum of hypertensive, diabetic, and hypertensive-diabetic heart disease. *Circulation*, 82, 848-855.
- Vavrova, A. and Simunek, T. (2012) DNA topoisomerase IIbeta: a player in regulation of gene expression and cell differentiation. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44, 834-837.
- Vejpongsa, P. and Yeh, E. T. (2014) Topoisomerase 2beta: a promising molecular target for primary prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 95, 45-52.
- Verrou, C., Zhang, Y., Zurn, C., Schamel, W. W. and Reth, M. (1999) Comparison of the tamoxifen regulated chimeric Cre recombinases MerCreMer and CreMer. *Biological chemistry*, 380, 1435-1438.



- Wartlick, F., Bopp, A., Henninger, C. and Fritz, G. (2013) DNA damage response (DDR) induced by topoisomerase II poisons requires nuclear function of the small GTPase Rac. *Biochimica et biophysica acta*, 1833, 3093-3103.
- Weber, K. T. (1989) Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *Journal of the American College of Cardiology*, 13, 1637-1652.
- Weil, J. and Schunkert, H. (2006) [Pathophysiology of chronic heart failure]. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society*, 95 Suppl 4, 1-15; quiz 16-17.
- Weiss, R. B. (1992) The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Seminars in oncology*, 19, 670-686.
- Wiesmann, F., Frydrychowicz, A., Rautenberg, J., Illinger, R., Rommel, E., Haase, A. and Neubauer, S. (2002) Analysis of right ventricular function in healthy mice and a murine model of heart failure by in vivo MRI. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 283, H1065-1071.
- Xiong, S., Van Pelt, C. S., Elizondo-Fraire, A. C., Fernandez-Garcia, B. and Lozano, G. (2007) Loss of Mdm4 results in p53-dependent dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 115, 2925-2930.
- Yang, X., Li, W., Prescott, E. D., Burden, S. J. and Wang, J. C. (2000) DNA topoisomerase IIbeta and neural development. *Science*, 287, 131-134.
- Yasue, H., Yoshimura, M., Sumida, H., Kikuta, K., Kugiyama, K., Jougasaki, M., Ogawa, H., Okumura, K., Mukoyama, M. and Nakao, K. (1994) Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation*, 90, 195-203.
- Yoshikane, H., Honda, M., Goto, Y., Morioka, S., Ooshima, A. and Moriyama, K. (1992) Collagen in dilated cardiomyopathy--scanning electron microscopic and immunohistochemical observations. *Japanese circulation journal*, 56, 899-910.
- Yu, C. M., Sanderson, J. E., Shum, I. O., Chan, S., Yeung, L. Y., Hung, Y. T., Cockram, C. S. and Woo, K. S. (1996) Diastolic dysfunction and natriuretic peptides in systolic heart failure. Higher ANP and BNP levels are associated with the restrictive filling pattern. *Eur Heart J*, 17, 1694-1702.
- Zhang, S., Liu, X., Bawa-Khalife, T., Lu, L. S., Lyu, Y. L., Liu, L. F. and Yeh, E. T. (2012) Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nature medicine*, 18, 1639-1642.
- Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C. A., Eeckhoute, J., Johnson, D. S., Bernstein, B. E., Nusbaum, C., Myers, R. M., Brown, M., Li, W. and Liu, X. S. (2008) Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome biology*, 9, R137.
- Zhao, S., Wu, H., Xia, W., Chen, X., Zhu, S., Zhang, S., Shao, Y., Ma, W., Yang, D. and Zhang, J. (2014) Periostin expression is upregulated and associated with myocardial fibrosis in human failing hearts. *Journal of cardiology*, 63, 373-378.
- Zhu, F., Li, Y., Zhang, J., Piao, C., Liu, T., Li, H. H. and Du, J. (2013) Senescent cardiac fibroblast is critical for cardiac fibrosis after myocardial infarction. *PloS one*, 8, e74535.
- Zhu, W., Trivedi, C. M., Zhou, D., Yuan, L., Lu, M. M. and Epstein, J. A. (2009) Inpp5f is a polyphosphoinositide phosphatase that regulates cardiac hypertrophic responsiveness. *Circulation research*, 105, 1240-1247.
- Zile, M. R., Bennett, T. D., St John Sutton, M., Cho, Y. K., Adamson, P. B., Aaron, M. F., Aranda, J. M., Jr., Abraham, W. T., Smart, F. W., Stevenson, L. W., Kueffer, F. J. and Bourge, R. C. (2008) Transition from chronic compensated to acute decompensated heart failure: pathophysiological insights obtained from continuous monitoring of intracardiac pressures. *Circulation*, 118, 1433-1441.

## 6. Anhang

*Tabelle 6.1 Anzahl der Reads sowie detektierte Gene bei der RNA Hochdurchsatz-Sequenzierung und Anzahl der signifikant veränderten Gene*

| Probe |                  | Reads/<br>Sequenzier-<br>richtung<br>(Mill.) | Alignierte<br>Reads für<br>beide<br>Sequenzier-<br>richtungen<br>(%) | Anzahl der<br>detektier-<br>baren Gene<br>von 22.553<br>Genen<br>insgesamt | sign.<br>veränderte<br>Gene<br>(cuffdiff) | sign. veränderte<br>Gene mit einer<br>mind. 2-fachen<br>Expressions-<br>steigerung |
|-------|------------------|--|--|--|---|--|
| R: 1  | Cre <sup>-</sup> | 20,2   | 92   | 11.156   | 135                                       | 128  |
|       | Cre <sup>+</sup> | 19,2   |  |  |   |  |
| R: 2  | Cre <sup>-</sup> | 28,1   |  |  |   |  |
|       | Cre <sup>+</sup> | 53,8   |  |  |   |  |

*Tabelle 6.2 Signifikant veränderte Gene mit einer mindestens 2-fachen Expressionssteigerung (RNA Hochdurchsatz-Sequenzierung)*

| mehr als 4-fach gesteigert |                          | 2-fach bis 4-fach gesteigert |                          | 2-fach bis 4-fach vermindert |                          |
|----------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|
| Genname                    | Expressions-<br>änderung | Genname                      | Expressions-<br>änderung | Genname                      | Expressions-<br>änderung |
| <b>Spink4</b>              | 61.47                    | <b>Rrm2</b>                  | 3.98                     | <b>Herpud1</b>               | 0.50                     |
| <b>Cd24a</b>               | 16.12                    | <b>Cxcl12</b>                | 3.93                     | <b>Nfil3</b>                 | 0.49                     |
| <b>Cnn1</b>                | 15.34                    | <b>Col8a1</b>                | 3.80                     | <b>Slc46a3</b>               | 0.48                     |
| <b>Cilp</b>                | 14.17                    | <b>Lman1l</b>                | 3.78                     | <b>Hspa1a</b>                | 0.47                     |
| <b>2210407C1<br/>8Rik</b>  | 12.76                    | <b>Snx10</b>                 | 3.74                     | <b>Ano10</b>                 | 0.47                     |
| <b>Nppa</b>                | 9.22                     | <b>Tubb2b</b>                | 3.69                     | <b>Prodh</b>                 | 0.47                     |
| <b>Serpib1a</b>            | 8.68                     | <b>Pdk3</b>                  | 3.55                     | <b>Atf3</b>                  | 0.46                     |
| <b>Prss23</b>              | 7.68                     | <b>Col15a1</b>               | 3.51                     | <b>Top2b</b>                 | 0.46                     |
| <b>Nlrc3</b>               | 7.54                     | <b>Nes</b>                   | 3.49                     | <b>Mid1ip1</b>               | 0.46                     |
| <b>Mfap4</b>               | 7.47                     | <b>Eef1a1</b>                | 3.47                     | <b>Arhgef19</b>              | 0.46                     |
| <b>Fam198b</b>             | 6.65                     | <b>Cd44</b>                  | 3.43                     | <b>Dusp1</b>                 | 0.46                     |
| <b>Ccdc68</b>              | 6.20                     | <b>Fbn1</b>                  | 3.41                     | <b>Irs2</b>                  | 0.46                     |
| <b>Col3a1</b>              | 6.05                     | <b>H2-Aa</b>                 | 3.38                     | <b>Pfkfb1</b>                | 0.44                     |
| <b>Postn</b>               | 5.44                     | <b>Dpysl3</b>                | 3.34                     | <b>Klf2</b>                  | 0.44                     |
| <b>Clea1</b>               | 5.37                     | <b>Ncam1</b>                 | 3.32                     | <b>Gadd45b</b>               | 0.43                     |
| <b>Plagl1</b>              | 4.90                     | <b>Col6a1</b>                | 3.30                     | <b>Gadd45g</b>               | 0.43                     |
| <b>Col5a2</b>              | 4.83                     | <b>Col1a2</b>                | 3.17                     | <b>Id2</b>                   | 0.42                     |
| <b>Krt18</b>               | 4.79                     | <b>Gm13157</b>               | 3.05                     | <b>Jun</b>                   | 0.41                     |
| <b>Tnni1</b>               | 4.70                     | <b>Acta1</b>                 | 3.02                     | <b>Angptl4</b>               | 0.39                     |
| <b>Colla1</b>              | 4.70                     | <b>Col6a2</b>                | 2.99                     | <b>Myl4</b>                  | 0.38                     |

| mehr als 4-fach gesteigert |                          | 2-fach bis 4-fach gesteigert |                          | 2-fach bis 4-fach vermindert |                          |
|----------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|
| Genname                    | Expressions-<br>änderung | Genname                      | Expressions-<br>änderung | Genname                      | Expressions-<br>änderung |
| <b>Zdhhc2</b>              | 4.67                     | <b>Litaf</b>                 | 2.93                     | <b>Dnajb1</b>                | 0.38                     |
| <b>Col5a3</b>              | 4.63                     | <b>Fnl</b>                   | 2.87                     | <b>Cngb3</b>                 | 0.37                     |
| <b>Slc22a17</b>            | 4.57                     | <b>Tmem176a</b>              | 2.83                     | <b>Myl7</b>                  | 0.36                     |
| <b>A930038C07Rik</b>       | 4.56                     | <b>Pea15a</b>                | 2.82                     | <b>Junb</b>                  | 0.35                     |
| <b>Arhgdig</b>             | 4.55                     | <b>Emp1</b>                  | 2.80                     | <b>6330403A02Rik</b>         | 0.35                     |
| <b>Serpina3n</b>           | 4.43                     | <b>Anxa2</b>                 | 2.77                     | <b>Zfp36</b>                 | 0.34                     |
| <b>Tnnt1</b>               | 4.23                     | <b>Sparc</b>                 | 2.75                     | <b>Snai3</b>                 | 0.34                     |
| <b>Snap91</b>              | 4.20                     | <b>Fstl1</b>                 | 2.74                     | <b>Kcnv2</b>                 | 0.33                     |
| <b>Leprel1</b>             | 4.18                     | <b>Bgn</b>                   | 2.71                     | <b>Fosb</b>                  | 0.31                     |
| <b>Mfap5</b>               | 4.13                     | <b>Nid1</b>                  | 2.68                     | <b>Arc</b>                   | 0.31                     |
|                            |                          | <b>Tgfb2</b>                 | 2.65                     | <b>Egr1</b>                  | 0.30                     |
|                            |                          | <b>Ankrd45</b>               | 2.62                     | <b>Fos</b>                   | 0.29                     |
|                            |                          | <b>Mobkl1a</b>               | 2.59                     | <b>Armc2</b>                 | 0.29                     |
|                            |                          | <b>Rab31</b>                 | 2.58                     | <b>Ier2</b>                  | 0.29                     |
|                            |                          | <b>Spna1</b>                 | 2.55                     | <b>Osgin1</b>                | 0.28                     |
|                            |                          | <b>Grk5</b>                  | 2.51                     | <b>Socs3</b>                 | 0.27                     |
|                            |                          | <b>Mmp2</b>                  | 2.48                     | <b>Sln</b>                   | 0.26                     |
|                            |                          | <b>Arl8a</b>                 | 2.47                     |                              |                          |
|                            |                          | <b>Ccdc80</b>                | 2.47                     |                              |                          |
|                            |                          | <b>Gnao1</b>                 | 2.41                     |                              |                          |
|                            |                          | <b>Mybpc2</b>                | 2.35                     |                              |                          |
|                            |                          | <b>Tubb2a</b>                | 2.34                     |                              |                          |
|                            |                          | <b>Carhsp1</b>               | 2.31                     |                              |                          |
|                            |                          | <b>1500017E21Rik</b>         | 2.31                     |                              |                          |
|                            |                          | <b>Akap2</b>                 | 2.31                     |                              |                          |
|                            |                          | <b>Masp1</b>                 | 2.29                     |                              |                          |
|                            |                          | <b>Sema3c</b>                | 2.27                     |                              |                          |
|                            |                          | <b>Ckap4</b>                 | 2.26                     |                              |                          |
|                            |                          | <b>Chm</b>                   | 2.22                     |                              |                          |
|                            |                          | <b>Myl9</b>                  | 2.21                     |                              |                          |
|                            |                          | <b>Ppm1e</b>                 | 2.19                     |                              |                          |
|                            |                          | <b>Atp13a3</b>               | 2.18                     |                              |                          |
|                            |                          | <b>Lyz2</b>                  | 2.16                     |                              |                          |
|                            |                          | <b>Nt5e</b>                  | 2.14                     |                              |                          |
|                            |                          | <b>Clic1</b>                 | 2.13                     |                              |                          |
|                            |                          | <b>Slc41a3</b>               | 2.13                     |                              |                          |
|                            |                          | <b>Efhd2</b>                 | 2.11                     |                              |                          |
|                            |                          | <b>2810474O19Rik</b>         | 2.10                     |                              |                          |
|                            |                          | <b>Pcolce</b>                | 2.06                     |                              |                          |
|                            |                          | <b>Synpo2l</b>               | 2.05                     |                              |                          |
|                            |                          | <b>Myl1</b>                  | 2.01                     |                              |                          |

**Tabelle 6.3 Bestimmung der Top2b-Deletion: Anzahl der verwendeten Tiere, Mittelwert, SD sowie SEM**

|  | n | M     | SD    | SEM   |
|--|---|-------|-------|-------|
| <b>Top2b mRNA-Expression (<math>2^{-\Delta Ct}</math>)</b>           |   |       |       |       |
| <b>Cre<sup>-</sup>-Mäuse</b>   | 7 | 0.041 | 0.026 | 0.010 |
| <b>Cre<sup>+</sup>-Mäuse</b>   | 9 | 0.012 | 0.006 | 0.002 |
| <b>nicht rekombinante Top2b-Allele (<math>2^{-\Delta Ct}</math>)</b> |   |       |       |       |
| <b>Cre<sup>-</sup> Mäuse</b>   | 5 | 0.072 | 0.037 | 0.017 |
| <b>Cre<sup>+</sup>-Mäuse</b>   | 7 | 0.026 | 0.012 | 0.005 |

**Tabelle 6.4 MRT: Anzahl der verwendeten Tiere, Mittelwert, SD sowie SEM**

|  | n    | M | SD     | SEM    |        |
|--|------|---|--------|--------|--------|
| <b>Ejektionsfraktion (%)</b>             |      |   |        |        |        |
| <b>Cre<sup>-</sup>-Mäuse</b>             | 0 w  | 7 | 50.010 | 6.492  | 2.454  |
|  | 8 w  | 7 | 52.500 | 8.550  | 3.232  |
|  | 16 w | 7 | 50.980 | 6.188  | 2.339  |
| <b>Cre<sup>+</sup>-Mäuse</b>             | 0 w  | 4 | 50.630 | 6.821  | 3.410  |
|  | 8 w  | 4 | 31.160 | 7.886  | 3.943  |
|  | 16 w | 4 | 31.170 | 11.780 | 5.892  |
| <b>LVEDV (<math>\mu</math>l)</b>         |      |   |        |        |        |
| <b>Cre<sup>-</sup>-Mäuse</b>             | 0 w  | 7 | 60.820 | 7.414  | 2.802  |
|  | 8 w  | 7 | 62.290 | 6.748  | 2.550  |
|  | 16 w | 7 | 59.870 | 6.478  | 2.448  |
| <b>Cre<sup>+</sup>-Mäuse</b>             | 0 w  | 4 | 62.680 | 13.960 | 6.978  |
|  | 8 w  | 4 | 93.250 | 9.270  | 4.635  |
|  | 16 w | 4 | 92.750 | 27.260 | 13.630 |
| <b>LVESV (<math>\mu</math>l)</b>         |      |   |        |        |        |
| <b>Cre<sup>-</sup>-Mäuse</b>             | 0 w  | 7 | 30.610 | 6.485  | 2.451  |
|  | 8 w  | 7 | 29.780 | 7.213  | 2.726  |
|  | 16 w | 7 | 29.660 | 6.407  | 2.422  |
| <b>Cre<sup>+</sup>-Mäuse</b>             | 0 w  | 4 | 31.470 | 10.290 | 5.147  |
|  | 8 w  | 4 | 64.700 | 13.880 | 6.939  |
|  | 16 w | 4 | 66.180 | 30.570 | 15.290 |
| <b>Schlagvolumen (<math>\mu</math>l)</b> |      |   |        |        |        |
| <b>Cre<sup>-</sup>-Mäuse</b>             | 0 w  | 7 | 30.220 | 3.850  | 1.455  |
|  | 8 w  | 7 | 32.520 | 4.832  | 1.826  |
|  | 16 w | 7 | 30.210 | 1.475  | 0.558  |
| <b>Cre<sup>+</sup>-Mäuse</b>             | 0 w  | 4 | 31.210 | 4.653  | 2.326  |
|  | 8 w  | 4 | 28.550 | 5.238  | 2.619  |
|  | 16 w | 4 | 26.570 | 3.465  | 1.732  |

| Körpergewicht (g)       |      |   |        |       |       |
|-------------------------|------|---|--------|-------|-------|
| Cre <sup>-</sup> -Mäuse | 0 w  | 7 | 25.500 | 2.991 | 1.131 |
|                         | 8 w  | 7 | 26.190 | 1.289 | 0.487 |
|                         | 16 w | 7 | 26.730 | 1.384 | 0.523 |
| Cre <sup>+</sup> -Mäuse | 0 w  | 4 | 30.080 | 5.963 | 2.982 |
|                         | 8 w  | 4 | 30.050 | 1.955 | 0.978 |
|                         | 16 w | 4 | 30.650 | 1.857 | 0.929 |

Tabelle 6.5 Echokardiographie: Anzahl der verwendeten Tiere, Mittelwert, SD sowie SEM

|                                      |      | n  | M      | SD     | SEM   |
|--------------------------------------|------|----|--------|--------|-------|
| Ejektionsfraktion (%)                |      |    |        |        |       |
| Cre <sup>-</sup> -Mäuse              | 0 w  | 4  | 75.070 | 11.420 | 5.711 |
|                                      | 1 w  | 4  | 63.740 | 3.270  | 1.635 |
|                                      | 2 w  | 4  | 64.920 | 2.716  | 1.358 |
|                                      | 4 w  | 4  | 55.360 | 6.289  | 3.145 |
|                                      | 8 w  | 4  | 61.380 | 14.370 | 7.185 |
|                                      | 11 w | 18 | 61.390 | 6.840  | 1.612 |
| Cre <sup>+</sup> -Mäuse              | 0 w  | 4  | 57.800 | 10.060 | 5.032 |
|                                      | 1 w  | 4  | 68.580 | 6.609  | 3.304 |
|                                      | 2 w  | 4  | 60.820 | 4.097  | 2.049 |
|                                      | 4 w  | 4  | 65.410 | 8.300  | 4.150 |
|                                      | 8 w  | 4  | 42.200 | 5.131  | 2.566 |
|                                      | 11 w | 17 | 46.820 | 10.990 | 2.666 |
| systolische Verzögerungsfraktion (%) |      |    |        |        |       |
| Cre <sup>-</sup> -Mäuse              | 0 w  | 4  | 44.250 | 10.550 | 5.277 |
|                                      | 1 w  | 4  | 34.140 | 2.482  | 1.241 |
|                                      | 2 w  | 4  | 35.000 | 2.058  | 1.029 |
|                                      | 4 w  | 4  | 28.480 | 4.140  | 2.070 |
|                                      | 8 w  | 4  | 33.020 | 10.020 | 5.012 |
|                                      | 11 w | 18 | 32.720 | 4.780  | 1.127 |
| Cre <sup>+</sup> -Mäuse              | 0 w  | 4  | 30.260 | 7.200  | 3.600 |
|                                      | 1 w  | 4  | 37.770 | 4.772  | 2.386 |
|                                      | 2 w  | 4  | 32.030 | 2.894  | 1.447 |
|                                      | 4 w  | 4  | 35.510 | 5.877  | 2.939 |
|                                      | 8 w  | 4  | 20.500 | 2.848  | 1.424 |
|                                      | 11 w | 17 | 23.520 | 6.582  | 1.596 |
| LVEDV (µl)                           |      |    |        |        |       |
| Cre <sup>-</sup> -Mäuse              | 0 w  | 4  | 63.000 | 13.770 | 6.885 |
|                                      | 1 w  | 4  | 65.200 | 12.420 | 6.208 |
|                                      | 2 w  | 4  | 65.520 | 6.020  | 3.010 |
|                                      | 4 w  | 4  | 67.810 | 5.994  | 2.997 |

|                              |      |    |        |        |       |
|------------------------------|------|----|--------|--------|-------|
|                              | 8 w  | 4  | 57.960 | 16.160 | 8.082 |
|                              | 11 w | 18 | 70.900 | 9.300  | 2.192 |
| <b>Cre<sup>+</sup>-Mäuse</b> | 0 w  | 4  | 61.900 | 5.672  | 2.836 |
|                              | 1 w  | 4  | 56.680 | 15.840 | 7.922 |
|                              | 2 w  | 4  | 63.060 | 7.115  | 3.557 |
|                              | 4 w  | 4  | 59.790 | 4.098  | 2.049 |
|                              | 8 w  | 4  | 74.200 | 4.071  | 2.036 |
|                              | 11 w | 17 | 80.000 | 15.800 | 3.831 |
| <b>LVESV (µl)</b>            |      |    |        |        |       |
| <b>Cre<sup>-</sup>-Mäuse</b> | 0 w  | 4  | 15.840 | 8.246  | 4.123 |
|                              | 1 w  | 4  | 23.550 | 4.403  | 2.201 |
|                              | 2 w  | 4  | 22.900 | 1.460  | 0.730 |
|                              | 4 w  | 4  | 30.520 | 6.720  | 3.360 |
|                              | 8 w  | 4  | 24.110 | 14.540 | 7.270 |
|                              | 11 w | 18 | 27.650 | 7.064  | 1.665 |
| <b>Cre<sup>+</sup>-Mäuse</b> | 0 w  | 4  | 26.410 | 7.694  | 3.847 |
|                              | 1 w  | 4  | 18.510 | 9.114  | 4.557 |
|                              | 2 w  | 4  | 24.570 | 2.086  | 1.043 |
|                              | 4 w  | 4  | 20.860 | 6.100  | 3.050 |
|                              | 8 w  | 4  | 42.950 | 5.276  | 2.638 |
|                              | 11 w | 17 | 43.610 | 17.270 | 4.189 |
| <b>Schlagvolumen (µl)</b>    |      |    |        |        |       |
| <b>Cre<sup>-</sup>-Mäuse</b> | 0 w  | 4  | 47.160 | 13.140 | 6.569 |
|                              | 1 w  | 4  | 41.640 | 8.745  | 4.373 |
|                              | 2 w  | 4  | 42.620 | 5.255  | 2.627 |
|                              | 4 w  | 4  | 37.280 | 1.648  | 0.824 |
|                              | 8 w  | 4  | 33.850 | 1.903  | 0.952 |
|                              | 11 w | 18 | 43.250 | 5.616  | 1.324 |
| <b>Cre<sup>+</sup>-Mäuse</b> | 0 w  | 4  | 35.490 | 4.247  | 2.124 |
|                              | 1 w  | 4  | 38.170 | 7.424  | 3.712 |
|                              | 2 w  | 4  | 38.490 | 6.327  | 3.163 |
|                              | 4 w  | 4  | 38.940 | 3.923  | 1.961 |
|                              | 8 w  | 4  | 31.250 | 3.605  | 1.803 |
|                              | 11 w | 17 | 36.390 | 6.838  | 1.658 |
| <b>Körpergewicht (g)</b>     |      |    |        |        |       |
| <b>Cre<sup>-</sup>-Mäuse</b> | 0 w  | 4  | 26.180 | 3.545  | 1.773 |
|                              | 1 w  | 4  | 25.850 | 0.911  | 0.456 |
|                              | 2 w  | 4  | 24.300 | 3.371  | 1.686 |
|                              | 4 w  | 4  | 24.050 | 3.838  | 1.919 |
|                              | 8 w  | 4  | 23.600 | 1.454  | 0.727 |
|                              | 11 w | 18 | 28.910 | 3.820  | 0.900 |
| <b>Cre<sup>+</sup>-Mäuse</b> | 0 w  | 4  | 21.700 | 1.793  | 0.896 |

|                                     |      |    |        |       |       |
|-------------------------------------|------|----|--------|-------|-------|
|                                     | 1 w  | 4  | 23.280 | 2.808 | 1.404 |
|                                     | 2 w  | 4  | 23.930 | 2.175 | 1.087 |
|                                     | 4 w  | 4  | 25.550 | 2.437 | 1.218 |
|                                     | 8 w  | 4  | 23.250 | 0.911 | 0.456 |
|                                     | 11 w | 17 | 27.860 | 3.742 | 0.908 |
| <b>LVMasse/Körpergewicht (mg/g)</b> |      |    |        |       |       |
| <b>Cre<sup>-</sup>-Mäuse</b>        | 0 w  | 4  | 3.292  | 0.061 | 0.031 |
|                                     | 1 w  | 4  | 3.075  | 0.150 | 0.075 |
|                                     | 2 w  | 4  | 3.433  | 0.196 | 0.098 |
|                                     | 4 w  | 4  | 3.345  | 0.540 | 0.270 |
|                                     | 8 w  | 4  | 2.796  | 0.295 | 0.148 |
|                                     | 11 w | 18 | 3.112  | 0.509 | 0.120 |
| <b>Cre<sup>+</sup>-Mäuse</b>        | 0 w  | 4  | 3.247  | 0.374 | 0.187 |
|                                     | 1 w  | 4  | 3.487  | 0.565 | 0.282 |
|                                     | 2 w  | 4  | 3.434  | 0.492 | 0.246 |
|                                     | 4 w  | 4  | 2.977  | 0.410 | 0.205 |
|                                     | 8 w  | 4  | 3.240  | 0.621 | 0.311 |
|                                     | 11 w | 17 | 3.097  | 0.421 | 0.102 |

*Tabelle 6.6 Expressionsänderung von ANP und BNP: Anzahl der verwendeten Tiere, Mittelwert, SD sowie SEM*

|  |      | <b>n</b> | <b>M</b> | <b>SD</b> | <b>SEM</b> |
|--|------|----------|----------|-----------|------------|
| <b>ANP mRNA-Expression (<math>2^{-\Delta Ct}</math>)</b> |      |          |          |           |            |
| <b>Cre<sup>-</sup>-Mäuse</b>                             | 0 w  | 8        | 2.195    | 1.634     | 0.578      |
|  | 1 w  | 7        | 1.309    | 0.864     | 0.327      |
|  | 2 w  | 8        | 1.433    | 0.500     | 0.177      |
|  | 4 w  | 8        | 1.957    | 0.749     | 0.265      |
|  | 8 w  | 7        | 2.003    | 0.628     | 0.237      |
|  | 20 w | 7        | 1.150    | 0.544     | 0.206      |
| <b>Cre<sup>+</sup>-Mäuse</b>                             | 0 w  | 8        | 2.999    | 2.427     | 0.858      |
|  | 1 w  | 7        | 4.097    | 1.469     | 0.555      |
|  | 2 w  | 8        | 4.182    | 2.586     | 0.914      |
|  | 4 w  | 8        | 8.188    | 6.427     | 2.272      |
|  | 8 w  | 8        | 27.080   | 15.290    | 5.405      |
|  | 20 w | 4        | 27.700   | 20.020    | 10.010     |
| <b>BNP mRNA-Expression (<math>2^{-\Delta Ct}</math>)</b> |      |          |          |           |            |
| <b>Cre<sup>-</sup>-Mäuse</b>                             | 0 w  | 8        | 0.369    | 0.156     | 0.055      |
|  | 1 w  | 7        | 0.743    | 0.247     | 0.093      |
|  | 2 w  | 8        | 1.092    | 0.369     | 0.130      |
|  | 4 w  | 8        | 1.048    | 0.421     | 0.149      |
|  | 8 w  | 7        | 1.115    | 0.533     | 0.201      |
|  | 20 w | 7        | 0.843    | 0.621     | 0.235      |

|                              |      |   |       |       |       |
|------------------------------|------|---|-------|-------|-------|
| <b>Cre<sup>+</sup>-Mäuse</b> | 0 w  | 8 | 0.605 | 0.354 | 0.125 |
|                              | 1 w  | 8 | 1.090 | 0.483 | 0.171 |
|                              | 2 w  | 8 | 1.475 | 0.623 | 0.220 |
|                              | 4 w  | 8 | 2.398 | 1.566 | 0.554 |
|                              | 8 w  | 8 | 4.053 | 3.332 | 1.178 |
|                              | 20 w | 4 | 3.838 | 2.075 | 1.038 |

**Tabelle 6.7 quantitative Fibroseauswertung: Anzahl der verwendeten Tiere, Mittelwert, SD sowie SEM**

|   |      | <b>n</b> | <b>M</b> | <b>SD</b> | <b>SEM</b> |
|---|------|----------|----------|-----------|------------|
| <b>quantitative Fibroseauswertung (%)</b> |      |          |          |           |            |
| <b>Cre<sup>-</sup>-Mäuse</b>              | 0 w  | 8        | 1.746    | 1.333     | 0.4712     |
|   | 1 w  | 7        | 1.656    | 0.9146    | 0.3457     |
|   | 2 w  | 8        | 1.973    | 1.222     | 0.4322     |
|   | 4 w  | 8        | 1.835    | 1.573     | 0.5561     |
|   | 8 w  | 7        | 1.407    | 0.7715    | 0.2916     |
|   | 20 w | 5        | 1.746    | 0.7568    | 0.3384     |
| <b>Cre<sup>+</sup>-Mäuse</b>              | 0 w  | 8        | 1.44     | 0.6708    | 0.2372     |
|   | 1 w  | 6        | 1.423    | 0.888     | 0.3625     |
|   | 2 w  | 7        | 1.733    | 0.8708    | 0.3291     |
|   | 4 w  | 7        | 3.316    | 3.376     | 1.276      |
|   | 8 w  | 7        | 8.401    | 6.303     | 2.382      |
|   | 20 w | 4        | 12.89    | 7.015     | 3.507      |

**Tabelle 6.8 Expressionsänderung von Colla1, Col3a1, Tgfb1 und Tgfb2: Anzahl der verwendeten Tiere, Mittelwert, SD sowie SEM**

|  |      | <b>n</b> | <b>M</b> | <b>SD</b> | <b>SEM</b> |
|--|------|----------|----------|-----------|------------|
| <b>Colla1 mRNA-Expression (2<sup>-ΔCt</sup>)</b> |      |          |          |           |            |
| <b>Cre<sup>-</sup>-Mäuse</b>                     | 0 w  | 8        | 0.085    | 0.035     | 0.012      |
|  | 1 w  | 7        | 0.104    | 0.033     | 0.013      |
|  | 2 w  | 8        | 0.083    | 0.018     | 0.006      |
|  | 4 w  | 8        | 0.073    | 0.023     | 0.008      |
|  | 8 w  | 7        | 0.099    | 0.031     | 0.012      |
|  | 20 w | 7        | 0.096    | 0.029     | 0.011      |
| <b>Cre<sup>+</sup>-Mäuse</b>                     | 0 w  | 8        | 0.080    | 0.063     | 0.022      |
|  | 1 w  | 8        | 0.170    | 0.046     | 0.016      |
|  | 2 w  | 8        | 0.123    | 0.058     | 0.020      |
|  | 4 w  | 8        | 0.236    | 0.154     | 0.054      |
|  | 8 w  | 8        | 0.342    | 0.149     | 0.053      |
|  | 20 w | 4        | 0.246    | 0.104     | 0.052      |
| <b>Col3a1 mRNA-Expression (2<sup>-ΔCt</sup>)</b> |      |          |          |           |            |



|                                 |      |   |       |       |       |
|---------------------------------|------|---|-------|-------|-------|
| <b>Cre<sup>-</sup>-Mäuse</b>    | 0 w  | 8 | 0.061 | 0.018 | 0.006 |
|                                 | 1 w  | 7 | 0.092 | 0.027 | 0.010 |
|                                 | 2 w  | 8 | 0.084 | 0.031 | 0.011 |
|                                 | 4 w  | 8 | 0.064 | 0.016 | 0.006 |
|                                 | 8 w  | 7 | 0.084 | 0.018 | 0.007 |
|                                 | 20 w | 7 | 0.096 | 0.021 | 0.008 |
| <b>Cre<sup>+</sup>-Mäuse</b>    | 0 w  | 8 | 0.053 | 0.043 | 0.015 |
|                                 | 1 w  | 8 | 0.159 | 0.047 | 0.017 |
|                                 | 2 w  | 8 | 0.108 | 0.050 | 0.018 |
|                                 | 4 w  | 8 | 0.291 | 0.186 | 0.066 |
|                                 | 8 w  | 8 | 0.336 | 0.154 | 0.054 |
|                                 | 20 w | 4 | 0.300 | 0.117 | 0.058 |
| <b>TGFβ1 (2<sup>-ΔCt</sup>)</b> |      |   |       |       |       |
| <b>Cre<sup>-</sup>-Mäuse</b>    | 0 w  | 8 | 0.006 | 0.004 | 0.001 |
|                                 | 1 w  | 8 | 0.006 | 0.003 | 0.001 |
|                                 | 2 w  | 8 | 0.006 | 0.002 | 0.001 |
|                                 | 4 w  | 8 | 0.005 | 0.002 | 0.001 |
|                                 | 8 w  | 7 | 0.007 | 0.003 | 0.001 |
|                                 | 20 w | 7 | 0.007 | 0.003 | 0.001 |
| <b>Cre<sup>+</sup>-Mäuse</b>    | 0 w  | 8 | 0.009 | 0.004 | 0.002 |
|                                 | 1 w  | 8 | 0.007 | 0.005 | 0.002 |
|                                 | 2 w  | 8 | 0.006 | 0.004 | 0.001 |
|                                 | 4 w  | 8 | 0.007 | 0.002 | 0.001 |
|                                 | 8 w  | 8 | 0.013 | 0.006 | 0.002 |
|                                 | 20 w | 4 | 0.013 | 0.004 | 0.002 |
| <b>TGFβ2 (2<sup>-ΔCt</sup>)</b> |      |   |       |       |       |
| <b>Cre<sup>-</sup>-Mäuse</b>    | 0 w  | 8 | 0.026 | 0.020 | 0.007 |
|                                 | 1 w  | 7 | 0.020 | 0.006 | 0.002 |
|                                 | 2 w  | 8 | 0.018 | 0.006 | 0.002 |
|                                 | 4 w  | 7 | 0.015 | 0.001 | 0.000 |
|                                 | 8 w  | 6 | 0.024 | 0.012 | 0.005 |
|                                 | 20 w | 7 | 0.016 | 0.005 | 0.002 |
| <b>Cre<sup>+</sup>-Mäuse</b>    | 0 w  | 8 | 0.026 | 0.018 | 0.007 |
|                                 | 1 w  | 7 | 0.032 | 0.017 | 0.007 |
|                                 | 2 w  | 8 | 0.031 | 0.020 | 0.007 |
|                                 | 4 w  | 7 | 0.033 | 0.031 | 0.012 |
|                                 | 8 w  | 8 | 0.089 | 0.095 | 0.034 |
|                                 | 20 w | 4 | 0.059 | 0.030 | 0.015 |

**Tabelle 6.9 Kontrollexperiment: Anzahl der verwendeten Tiere, Mittelwert, SD sowie SEM**

|                                   |     | n | M     | SD    | SEM   |
|-----------------------------------|-----|---|-------|-------|-------|
| <b>ANP (2<sup>-ΔCt</sup>)</b>     |     |   |       |       |       |
| <b>Cre<sup>-</sup>-Mäuse</b>      | 2 w | 6 | 0.459 | 0.247 | 0.101 |
|                                   | 8 w | 6 | 0.650 | 0.591 | 0.241 |
| <b>Cre<sup>+</sup>-Mäuse</b>      | 2 w | 6 | 0.712 | 0.587 | 0.240 |
|                                   | 8 w | 6 | 4.668 | 2.420 | 0.988 |
| <b>Cre<sup>+</sup> WT-Mäuse</b>   | 2 w | 6 | 1.360 | 1.691 | 0.690 |
|                                   | 8 w | 7 | 0.748 | 0.471 | 0.178 |
| <b>Coll1a1 (2<sup>-ΔCt</sup>)</b> |     |   |       |       |       |
| <b>Cre<sup>-</sup>-Mäuse</b>      | 2 w | 6 | 0.094 | 0.053 | 0.022 |
|                                   | 8 w | 6 | 0.063 | 0.032 | 0.013 |
| <b>Cre<sup>+</sup>-Mäuse</b>      | 2 w | 6 | 0.101 | 0.057 | 0.023 |
|                                   | 8 w | 6 | 0.197 | 0.060 | 0.025 |
| <b>Cre<sup>+</sup> WT-Mäuse</b>   | 2 w | 6 | 0.083 | 0.047 | 0.019 |
|                                   | 8 w | 7 | 0.062 | 0.038 | 0.014 |
| <b>Tgfb2 (2<sup>-ΔCt</sup>)</b>   |     |   |       |       |       |
| <b>Cre<sup>-</sup>-Mäuse</b>      | 2 w | 6 | 0.008 | 0.004 | 0.002 |
|                                   | 8 w | 6 | 0.006 | 0.003 | 0.001 |
| <b>Cre<sup>+</sup>-Mäuse</b>      | 2 w | 6 | 0.009 | 0.005 | 0.002 |
|                                   | 8 w | 6 | 0.013 | 0.004 | 0.002 |
| <b>Cre<sup>+</sup> WT-Mäuse</b>   | 2 w | 6 | 0.008 | 0.005 | 0.002 |
|                                   | 8 w | 7 | 0.007 | 0.004 | 0.001 |

**Tabelle 6.10 ChIP-seq Sequenzfragmente und Bindungsstellen**

|                                | ChIP-seq Sequenzfragmente (einseitig) und Bindungsstellen (FDR=0.05) | Replik 1                                    |             | Replik 2                                |             |
|--------------------------------|--|---|-------------|---|-------------|
|                                |  | IP Probe                                    | Input Probe | IP Probe                                | Input Probe |
| <b>Reads</b>                   | total, sequenziert (Mill.)   | 59,8  | 65,5        | 35,3                                    | 36          |
|                                | total, einmalig aligniert (Mill.)                                    | 38,1  | 42,84       | 24,1                                    | 24,1        |
|                                | total, nicht aligniert (Mill.)                                       | 6,2   | 7,6%        | 1,8                                     | 3,6         |
|                                | total, mehr als einmalig aligniert (Mill.)                           | 15,5  | 15,0        | 9,4                                     | 8,4         |
| <b>Bindungsstellen (MACS2)</b> | Bindungsstellenanzahl  | 120   |             | 10                                      |             |
| <b>PeakAnalyzer</b>            | Bindungsstellenanzahl  | 112 (davon 70 in Genen, 42 im Intergenraum) |             | 8 (davon 6 in Genen, 2 im Intergenraum) |             |

*Tabelle 6.11 Chromatin-Immunpräzipitation Top2b: Anzahl der verwendeten Tiere, Mittelwert, SD sowie SEM*

|                              | <b>n</b> | <b>M</b> | <b>SD</b> | <b>SEM</b> |
|------------------------------|----------|----------|-----------|------------|
| <b>Prozent vom Input (%)</b> |          |          |           |            |
| <b>Arl15</b>                 | 5        | 0.066    | 0.021     | 0.010      |
| <b>Clint1</b>                | 5        | 0.053    | 0.012     | 0.005      |
| <b>Inpp5f</b>                | 5        | 0.056    | 0.012     | 0.006      |
| <b>Lrrc28</b>                | 5        | 0.025    | 0.011     | 0.005      |
| <b>Pfkfb4</b>                | 5        | 0.038    | 0.011     | 0.005      |
| <b>Gm14005</b>               | 5        | 0.028    | 0.008     | 0.004      |
| <b>Itgav</b>                 | 5        | 0.035    | 0.006     | 0.003      |
| <b>Mb21d2</b>                | 5        | 0.056    | 0.010     | 0.004      |
| <b>Egf</b>                   | 5        | 0.033    | 0.006     | 0.003      |
| <b>Fos</b>                   | 5        | 0.003    | 0.001     | 0.000      |
| <b>Jun</b>                   | 5        | 0.003    | 0.001     | 0.000      |

*Tabelle 6.12 Chromatin-Immunpräzipitation p53: Anzahl der verwendeten Tiere, Mittelwert, SD sowie SEM*

|  | <b>n</b> | <b>M</b> | <b>SD</b> | <b>SEM</b> |
|--|----------|----------|-----------|------------|
| <b>Prozent vom Input (%) Cre<sup>-</sup></b> |          |          |           |            |
| <b>Colla1</b>                                | 3        | 0.005    | 0.007     | 0.004      |
| <b>Mmp2</b>                                  | 3        | 0.011    | 0.011     | 0.007      |
| <b>Tgfb2</b>                                 | 3        | 0.005    | 0.007     | 0.004      |
| <b>Prozent vom Input (%) Cre<sup>+</sup></b> |          |          |           |            |
| <b>Colla1</b>                                | 4        | 6.886    | 8.73      | 4.366      |
| <b>Mmp2</b>                                  | 4        | 6.931    | 7.413     | 3.706      |
| <b>Tgfb2</b>                                 | 4        | 5.934    | 7.246     | 3.623      |

## Abkürzungsverzeichnis

| <b>A</b>                    |   |
|-----------------------------|---|
| <b>ACE-Hemmer</b>           | Angiotensin-konvertierendes Enzym-Hemmer                    |
| <b>ANP</b>                  | atriales natriuretisches Peptid                             |
| <b>B</b>                    |   |
| <b>BCA</b>                  | Bicinchoninsäure Assay                                      |
| <b>BNP</b>                  | natriuretisches Peptid Typ B                                |
| <b>bp</b>                   | Basenpaare  |
| <b>BSA</b>                  | Rinderserumalbumin  |
| <b>C</b>                    |   |
| <b>ca.</b>                  | circa   |
| <b>Ca</b>                   | Calcium   |
| <b>ChIP</b>                 | Chromatin-Immunpräzipitation                                |
| <b>ChIP-seq</b>             | Chromatin-Immunpräzipitations-Sequenzierung                 |
| <b>Col1a1</b>               | Kollagen Typ I  |
| <b>Col3a1</b>               | Kollagen Typ III  |
| <b>D</b>                    |   |
| <b>DNA</b>                  | Desoxyribonukleinsäure                                      |
| <b>DEPC- H<sub>2</sub>O</b> | Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser                      |
| <b>DOX</b>                  | Doxorubicin   |
| <b>DRZ</b>                  | Dexrazoxan  |
| <b>E</b>                    |   |
| <b>Echo</b>                 | Echokardiographie   |
| <b>ECL- Reagenz</b>         | Enhanced Chemoluminescence-Reagenz                          |
| <b>ECM</b>                  | Extrazelluläre Matrix                                       |
| <b>EF</b>                   | Ejektionsfraktion   |
| <b>EtOH</b>                 | Ethanol   |
| <b>EVG</b>                  | Elastika-van-Gieson-Färbung                                 |
| <b>F</b>                    |   |
| <b>FCS</b>                  | Fetales Kälberserum   |
| <b>FPKM</b>                 | Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped |
| <b>FS</b>                   | Fractional Shortening; systolische Verkürzungsfraction      |
| <b>G</b>                    |   |
| <b>GA</b>                   | Glutaraldehyd   |
| <b>°C</b>                   | Grad Celsius  |
| <b>g</b>                    | Gramm   |
| <b>H</b>                    |   |
| <b>h</b>                    | Stunde  |
| <b>HI</b>                   | Herzinsuffizienz  |

|                |   |
|----------------|---|
| <b>H&amp;E</b> | Hämatoxylin& Eosin-Färbung                      |
| <b>Hz</b>      | Hertz   |
| <b>I</b>       |   |
| <b>IAA</b>     | Isoamylalkohol                                  |
| <b>K</b>       |   |
| <b>kb</b>      | Kilobase  |
| <b>KI</b>      | Kardiomyozyten                                  |
| <b>kDa</b>     | Kilodalton                                      |
| <b>L</b>       |   |
| <b>LVEDV</b>   | linksventrikuläres enddiastolisches Volumen     |
| <b>LVESV</b>   | linksventrikuläres endsystolisches Volumen      |
| <b>LVMasse</b> | linksventrikuläre Masse                         |
| <b>M</b>       |   |
| <b>mA</b>      | Milliampere                                     |
| <b>MG</b>      | Masson-Goldner-Färbung                          |
| <b>min</b>     | Minuten   |
| <b>ml</b>      | Milliliter                                      |
| <b>mm</b>      | Millimeter                                      |
| <b>mM</b>      | Millimolar                                      |
| <b>MMP</b>     | Matrixmetalloproteinasen                        |
| <b>mRNA</b>    | messenger RNA                                   |
| <b>MRT</b>     | Magnetresonanztomographie                       |
| <b>MTAL</b>    | medizinisch-technische Laboratoriumsassistenten |
| <b>µg</b>      | Mikrogramm                                      |
| <b>µl</b>      | Mikroliter                                      |
| <b>µm</b>      | Mikrometer                                      |
| <b>N</b>       |   |
| <b>nm</b>      | Nanometer                                       |
| <b>O</b>       |   |
| <b>OsO4</b>    | Osmiumtetroxid                                  |
| <b>P</b>       |   |
| <b>PFA</b>     | Paraformaldehyd                                 |
| <b>PCR</b>     | Polymerase-Ketten-Reaktion                      |
| <b>PVDF</b>    | Polyvinylidenfluorid-Membran                    |
| <b>PI</b>      | Proteinase-Inhibitor                            |
| <b>R</b>       |   |
| <b>RAA</b>     | Renin-Angiotensin-Aldosteron                    |
| <b>18srRNA</b> | 18s ribosomale RNA                              |
| <b>RNA-seq</b> | RNA-Sequenzierung                               |
| <b>RT</b>      | Raumtemperatur                                  |
| <b>RPM</b>     | rounds per minute                               |
| <b>S</b>       |   |

|                              |   |
|------------------------------|---|
| <b>SDS-Page</b>              | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| <b>SV</b>                    | Schlagvolumen                                       |
| <b>T</b>                     |   |
| <b>TAM</b>                   | Tamoxifen   |
| <b>TGF<math>\beta</math></b> | transformierender Wachstumsfaktor                   |
| <b>Top2b/ TOP2B</b>          | Topoisomerase 2 beta                                |
| <b>TSS</b>                   | Transkriptionsstartseite                            |
| <b>V</b>                     |   |
| <b>V</b>                     | Volt  |
| <b>vs.</b>                   | versus  |
| <b>W</b>                     |   |
| <b>WT</b>                    | Wildtyp   |

# Danksagung

## Curriculum Vitae