

Epigenetik von Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Forscher setzen auf »RNA-Therapeutika«

von Ralf Brandes

Über epigenetische Prozesse können Umweltfaktoren und Lebensstil unsere Entwicklung und Gesundheit beeinflussen – auch über Generationen hinweg –, ohne die Sequenz der DNA zu verändern. Erst in jüngster Zeit ist es möglich, die Mechanismen auf der molekularen Ebene zu entschlüsseln. Für Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind erste Ansätze für epigenetische Therapien in Sicht.

Dass Stress und die Ernährung der Mutter – vor der Schwangerschaft – Einfluss auf Gewicht, Stoffwechsel und Erkrankungshäufigkeiten der Nachkommen haben, wird epigenetisch erklärt. Auch dass sich aus Bienenlarven durch die Fütterung mit Gelée royale Königinnen und nicht Arbeiterinnen entwickeln, ist ein epigenetischer Prozess. In der Entwicklungsbiologie hat Epigenetik die Aufgabe, den Entwicklungsprozess und somit die zelluläre Differenzierung in eine Richtung zu lenken. Beim ausgewachsenen Organismus fördert Epigenetik dagegen Stabilität, reduziert schädliche Umwelteinflüsse und limitiert die Schwankungsbreite der zellulären Reaktion.

Die Erforschung der Mechanismen, die epigenetischen Phänomenen zugrunde liegen, hat Wissenschaftler lange Zeit vor große Probleme gestellt. Es fehlten Technologien, mit denen man das »Epigenom« beschreiben und manipulieren konnte. Den methodischen Fortschritten in der Hochdurchsatz-Sequenzierung von DNA (»Next Generation Sequencing«) und der Bioinformatik ist es zu verdanken, dass mittlerweile eine Vielzahl von epigenetischen Mechanismen identifiziert sind. Nun stellt sich die Frage, wie man dieses Wissen therapeutisch nutzen kann.

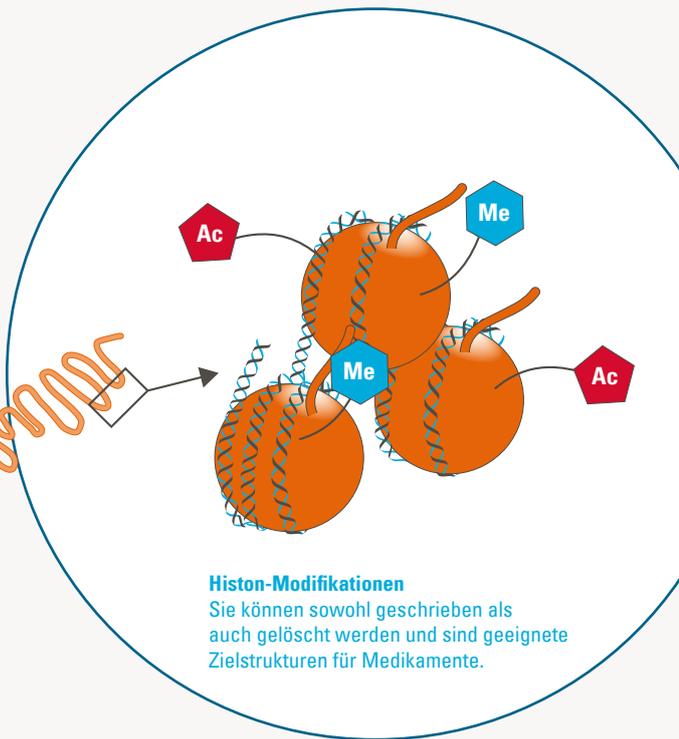
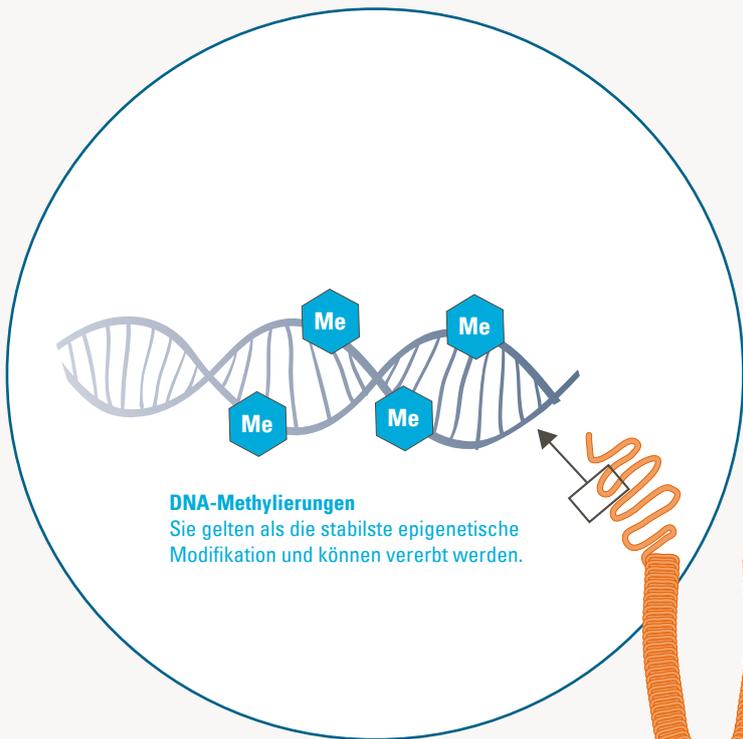
Ohne Anspruch auf Vollständigkeit müssen hierfür drei sehr verschiedene epigenetische Mechanismen unterschieden werden: Histon-Modifikationen, DNA-Methylierungen und nicht kodierende RNAs.

DNA-Methylierung inaktiviert Gene

Eine wichtige Rolle spielen beim epigenetischen Prozess Methylgruppen, die von Enzymen (DNA-Methyltransferasen, DNMTs) an bestimmten Stellen der Erbsubstanz DNA angeheftet werden. Gemeinhin führt diese DNA-Methylierung zu einer Inaktivierung des betreffenden Gens. Sehr grundsätzliche Prozesse wie z. B. die Entscheidung, ob sich eine Arbeiterin oder eine Bienenkönigin entwickelt, sind Folge einer differenziellen DNA-Methylierung. Das Wort »differenziell« meint dabei, dass bei Arbeiterin und Königin unterschiedliche DNA-Bereiche methyliert und damit inaktiviert sind.

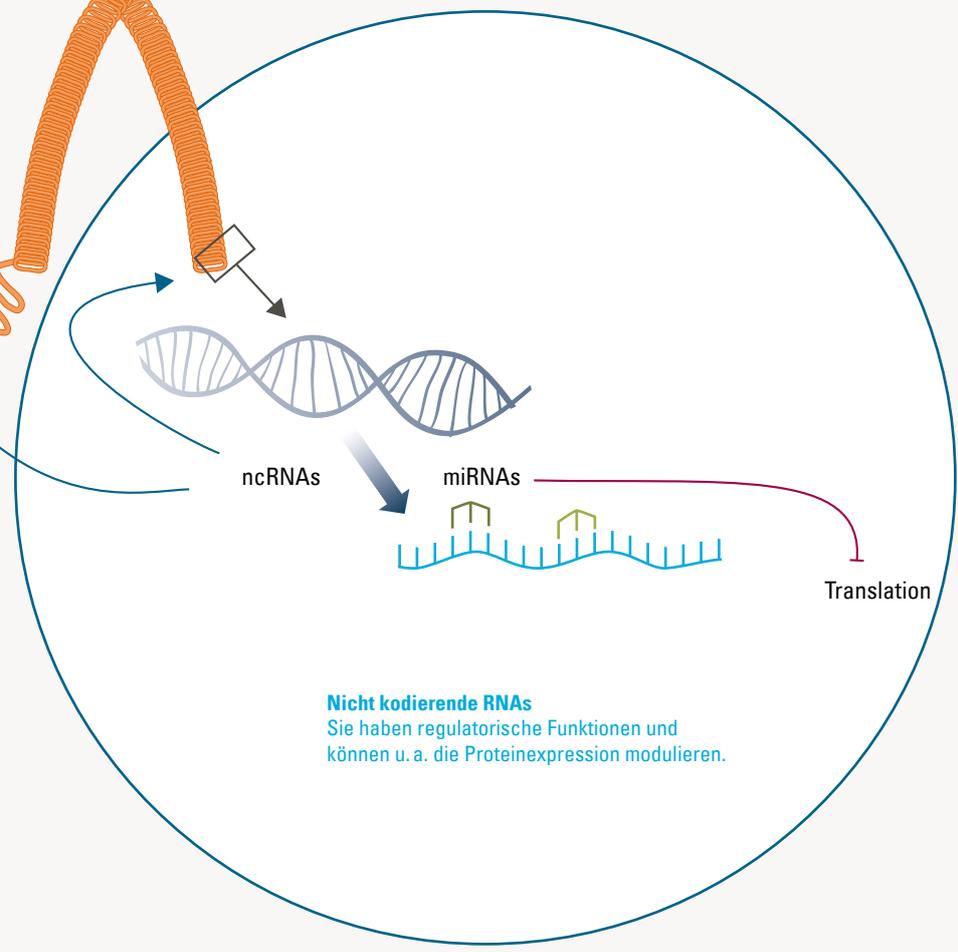
Einige DNA-Methylierungen werden sogar vererbt, da bei der Neusynthese des DNA-Strangs die Methylierung des Mutterstrangs mithilfe eines Enzyms auf den Tochterstrang kopiert wird. Daher gelten DNA-Methylierungen als die stabilste, am wenigsten dynamische epigenetische Modifikation. Zwar können Zel-

Epigenetische Mechanismen



AUF DEN PUNKT GEBRACHT

- Dank neuer Sequenzierungstechnologien und der Bioinformatik ist es heute möglich, die Mechanismen der Epigenetik zu entschlüsseln.
- Wichtige epigenetische Prinzipien sind Histon-Modifikationen, DNA-Methylierungen und nicht kodierende RNAs.
- Histon-Modifikationen sind dynamisch – Writer-Proteine schreiben sie, Eraser-Proteine löschen sie.
- 97 Prozent der menschlichen DNA ist nicht Protein-kodierend, sondern bildet die Blaupause für nicht kodierende RNAs. Diese haben wichtige regulatorische Funktionen.
- Epigenetische Mechanismen tragen zur Gefäßneubildung, zu Umbauprozessen des Herzens und zur Atherosklerose bei.
- RNAs sind wichtige epigenetische »Drug-Targets«, die ein günstiges Wirkungs- zu Nebenwirkungsverhältnis versprechen.



 Methylierung
 Azetylierung

Wenn eine Bienenlarve mit Gelée royale gefüttert wird, entwickelt sich statt einer Arbeiterin eine Königin. Der Prozess ist epigenetisch vermittelt und geht mit einer Änderung der DNA-Methylierung einher.



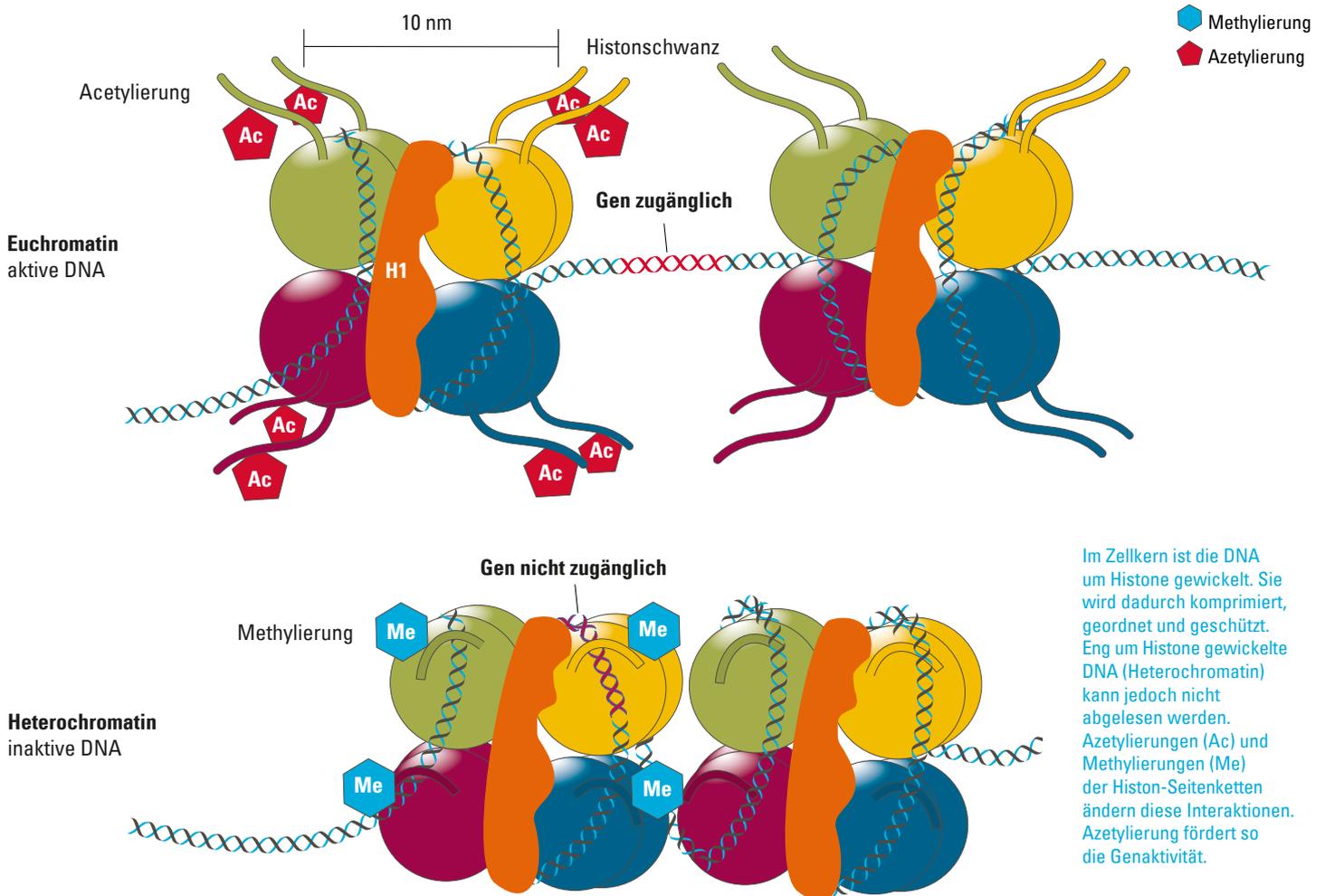
len Methylierungen über einen komplexen Stoffwechselweg wieder entfernen – eine Bedeutung dieses Prozesses ist jedoch bisher im Wesentlichen nur für die früheste Embryonalentwicklung nachgewiesen, in der sich die Zellen noch in unterschiedliche Zelltypen ausdifferenzieren können (Boland et al., 2014). Für die nachfolgende Entwicklung gilt, dass der DNA-Methylierungsgrad zunimmt, je differenzierter Organe bzw. Organismen sich entwickeln. Einige in der Therapie hämatologischer Krebserkrankungen eingesetzte Substanzen haben

gezeigt, dass sie die DNA-Methylierung hemmen können, z.B. die Substanz 5-Azacytidine. Sie wird bei einigen Leukämieformen (MDS, CMML, AML) klinisch eingesetzt und ist in der Lage, Krebs zurückzudrängen. Damit verlängert 5-Azacytidine bei relativ geringen Nebenwirkungen deutlich die Gesamtüberlebenszeit (Bohl et al., 2018).

Histon-Bindungen: erkennen, verstärken oder löschen

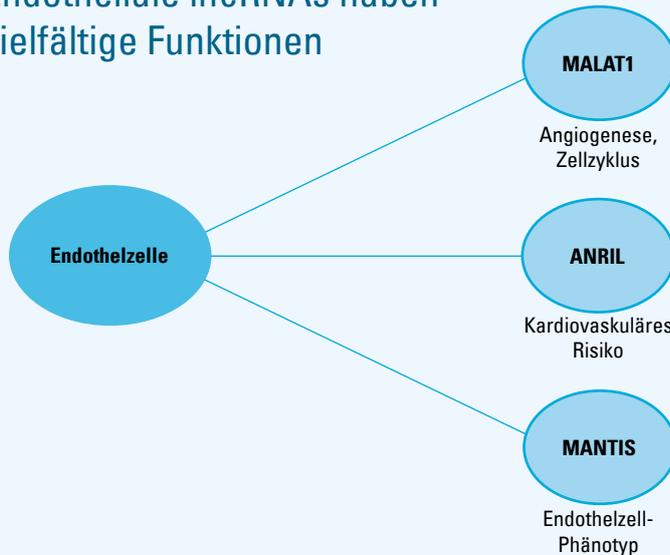
Anders als bei Bakterien (Prokaryonten) ist bei den kernhaltigen Zellen der Eukaryonten, also auch beim Menschen, die DNA um Histon-Proteine gewickelt. Hierdurch werden die langen DNA-Moleküle in einer geordneten Struktur soweit komprimiert, dass sie in den Zellkern passen. Aufgrund von elektrochemischen Wechselwirkungen der sauren DNA mit den basischen Histonen führt diese Bindung gleichzeitig dazu, dass die DNA nur noch bedingt für den Ableseprozess (die Transkription) zur Verfügung steht. Durch chemische Modifikation von Seitenketten der Histone kann die Stärke der Bindung jedoch

Histon-Modifikationen bestimmen den Kondensationsgrad der DNA



Im Zellkern ist die DNA um Histone gewickelt. Sie wird dadurch komprimiert, geordnet und geschützt. Eng um Histone gewickelte DNA (Heterochromatin) kann jedoch nicht abgelesen werden. Azetylierungen (Ac) und Methylierungen (Me) der Histon-Seitenketten ändern diese Interaktionen. Azetylierung fördert so die Genaktivität.

Endotheliale lncRNAs haben vielfältige Funktionen



Die lncRNA MALAT1

MALAT1 steht für »Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1«. Bei verschiedenen Krebserkrankungen ist die Menge dieser langen, nicht Protein-kodierenden RNA (lncRNA) massiv gesteigert. Anders als viele andere lncRNAs ist MALAT1 in Säugetieren »konserviert« – d. h. sowohl z. B. Mäuse als auch Menschen exprimieren sie. Es gibt vielfältige Versuche, den Wirkmechanismus von MALAT1 zu erklären. Unter anderem scheint MALAT1 microRNAs zu binden und so die Genexpression zu beeinflussen. Auch wird eine Funktion als »arcRNA« diskutiert, also einer RNA, die die Architektur des Zellkerns beeinflusst. Hierüber könnte MALAT1 Proteine und andere RNAs in funktionell-inaktiven Bereichen des Zellkerns fixieren. MALAT1 war die erste lncRNA, für die eine Bedeutung im vaskulären System gezeigt wurde. Wissenschaftler im CPI wiesen dabei nach, dass der Verlust von MALAT1 die Angiogenese (Gefäßneubildung) reduziert (Michalik et al., 2014) und die Atherosklerose fördert.

Anril – lncRNAs als kardiovaskulärer Risikofaktor?

Genome-wide association studies« (GWAS-Studien) versuchen, die genetische Basis von Erkrankungen zu identifizieren, indem sie die Häufigkeit bestimmter genetischer Marker mit der Häufigkeit des Auftretens von Erkrankungen assoziieren. GWAS-Studien haben vielfach nachgewiesen, dass eine DNA-Region auf Chromosom 9 (Chr9p21) einen Risikofaktor für das Auftreten von Atherosklerose trägt. Nur befindet sich in dieser Region kein für ein Protein kodierendes Gen! Vielmehr liegt dort die lncRNA ANRIL (antisense non coding RNA in the INK4 locus). Interessanterweise zeigte sich, dass der genetische Status die Produktion des lncRNA ANRIL beeinflusst. Durch alternatives Splicing wird entweder ein langes lineares RNA-Molekül produziert oder eine kreisförmige, zirkuläre RNA. Zirkuläres ANRIL versetzt glatte Gefäßmuskulzellen und Fresszellen der angeborenen Immunität (Makrophagen) in den Ruhezustand. Lineares ANRIL regt sie dagegen zum Wachsen und Auswandern an, was Atherosklerose begünstigt (Holdt und Teupser, 2018).

tiv leicht therapeutisch beeinflussbar und haben komplexe Auswirkungen auf die Genexpression. lncRNAs sind dagegen bedeutend komplexer, zeigen jedoch eine stärkere Gewebespezifität und teilweise sehr selektive Effekte (siehe »MicroRNAs hemmen – Herzkrankheiten heilen«, Seite 25) (Lucas et al., 2018).

Epigenetische Regulation von Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Da die Epigenetik starke Einflüsse auf die Genexpression hat, ist es nicht überraschend, dass sie bei chronisch verlaufenden Herz-Kreislauf-Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt. So wirken Hemmstoffe der Histon-modifizierende Enzyme aus der Familie der HDACs (Histondeacetylaseinhibitoren) wie Trichostatin A oder Valproinsäure im Tiermodell hemmend auf das überschießende Wachstum glatter Muskelzellen nach Gefäßverletzung z. B. im Rahmen einer Ballondilatation eines verengten Herzkranzgefäßes. Nach einem Herzinfarkt kommt es häufig zu ungünstigen Umbauprozessen des verbleibenden Herzgewebes (»Remodelling«), was ebenfalls durch HDAC-Inhibitoren gehemmt werden kann. Schließlich fördern die Substanzen die Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese). Die Kombination von verstärkter Gefäßneubildung bei gleichzeitigem Schutz des Herzens machen HDAC-Inhibitoren zu attraktiven Molekülen in der Therapie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Eine ähnliche Entwicklung zeichnet sich für die bereits erwähnten Bromodomain-Inhibitoren ab: Das Molekül JQ1, welches das Reader-Protein BRD4 hemmt, reduziert z. B. ebenfalls das ungünstige Remodelling nach Herzinfarkt (Alexanian et al., 2019).

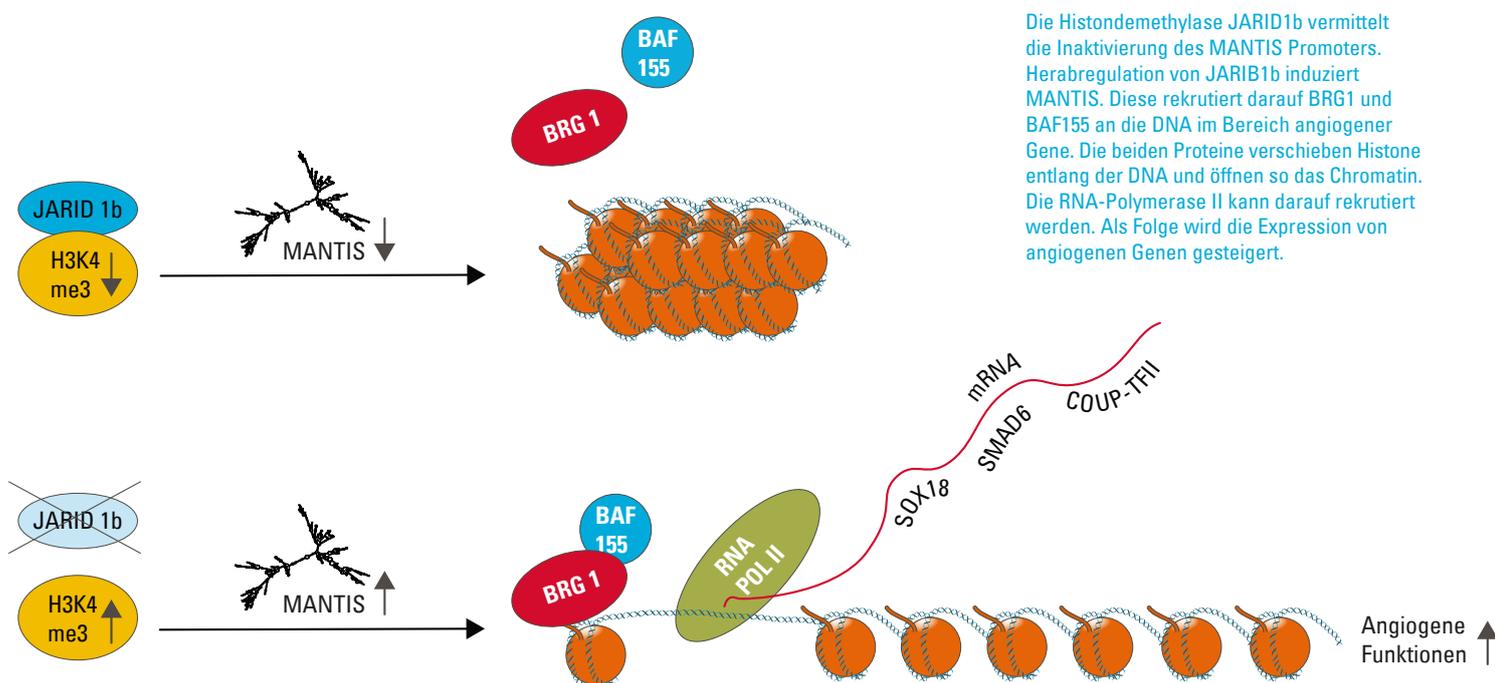
Das gegenwärtige Forschungsinteresse fokussiert jedoch stark auf nicht kodierende RNAs, da wir davon weit mehr besitzen als von den Histon-modifizierenden Enzymen. Während unser Genom für weniger als 100 Histon-modifizierende Enzyme kodiert, können von ihm weit mehr als 10000 nicht kodierende RNA-Moleküle abgeschrieben werden. Somit ist es möglich, nicht kodierende RNAs zu identifizieren, die z. B. nur im Erkrankungsfall produziert werden, nur in der erkrankten Zelle vorliegen und spezifisch die Erkrankung vermitteln. Zumindest konzeptionell lässt dies im Falle einer therapeutischen Nutzung ein günstigeres Wirkungs- zu Nebenwirkungsverhältnis erwarten. Am besten sind bisher die microRNAs untersucht: Diese können im Tiermodell sowohl fördernd (z. B. miR-21, miR-208) als auch hemmend (z. B. miR-133, miR-29) auf die Entwicklung der Herzinsuffizienz wirken. Ähnliches gilt für das Gefäßwachstum, z. B. nach Verletzung durch Ballondilatation oder bei der Entwicklung einer Atherosklerose. miR-23b

MANTIS schützt vor Atherosklerose

Da Endothelzellen das Innere von Blutgefäßen auskleiden, sind sie ständig dem Blutstrom ausgesetzt. Dieser erzeugt an den Zellen eine Schubspannung, die einen schützenden Effekt auf die Zellen hat und die endotheliale Genexpression beeinflusst. MANTIS ist eine der lncRNAs, die in dieser Situation von der Zelle produziert wird. Der Name MANTIS (engl. für Gottesanbeterin) spielt auf die vorhergesagte 3D-Struktur der lncRNA an. Funktionell rekrutiert MANTIS einen Chromatin-Remodelling-

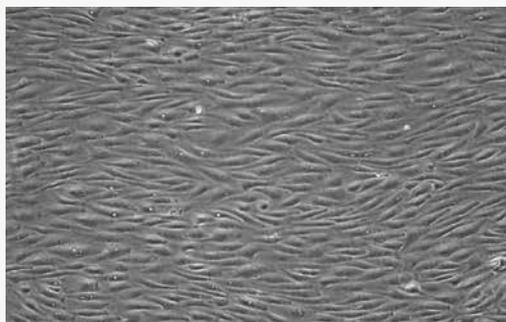
Komplex namens SWI/SNF, so dass die Histondekoration der DNA verändert wird. Infolgedessen führen Endothelzellen ein spezielles genetisches Programm aus, was zur Ausprägung ihres endothelialen Phänotyps führt. MANTIS ermöglicht z.B., dass sich Endothelzellen entlang des Blutstroms ausrichten und befähigt sie zur Gefäßneubildung (Leisegang et al., 2017). Die schützenden Effekte von Cholesterinsenkern der Klasse der »Statine« werden u.a. über MANTIS vermittelt (Leisegang et al., 2019).

Die lncRNA MANTIS fördert die Angiogenese

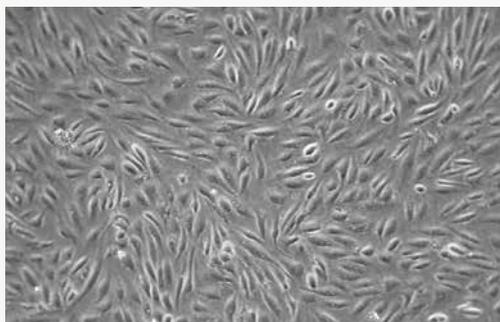


Effekt von MANTIS auf die Flussausrichtung von Endothelzellen

Kontrolle



lncRNA MANTIS fehlt



Humane Nabelschnurendothelzellen wurden in Zellkultur kontinuierlich für zwei Tage mit Zellkulturmedium überspült, um den Blutfluss zu simulieren. Eine typische, spezifische Eigenschaft von Endothelzellen ist, dass sie den Blutfluss erfassen können. In Folge richten sie sich entlang des Blutflusses aus. Verlust der lncRNA MANTIS verhindert die Ausprägung des typischen endothelialen Phänotyps. U. a. verlieren die Zellen die Fähigkeit, sich im Fluss auszurichten. Durchlichtmikroskopie. Eichmarke: 100µm

Literatur

Alexanian, M. et al.: Epigenetic therapies in heart failure, in: *Journal of molecular and cellular cardiology* 130, 2019, S. 197-204, DOI: 10.1016/j.jmcc.2019.04.012.

Boeckel, J et al.: Identification and Characterization of Hypoxia-Regulated Endothelial Circular RNA, in: *Circulation research* 117 (10), 2015, S. 884-890, DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306319.

Bohl, SR et al.: Epigenetic therapy: azacytidine and decitabine in acute myeloid leukemia, in: *Expert review of hematology* 11 (5), 2018, S. 361-371, DOI: 10.1080/17474086.2018.1453802.

Boland, MJ et al.: Epigenetic regulation of pluripotency and differentiation, in: *Circulation research* 115 (2), 2014, S. 311-324, DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.301517.

Ceccacci, E et al.: Inhibition of histone deacetylases in cancer therapy: lessons from leukaemia, in: *British journal of cancer* 114 (6), 2016, S. 605-611, DOI: 10.1038/bjc.2016.36.

Holdt, L et al.: Lnc-ing Genetic Variation at the Chromosome 9p21 Locus to Molecular Mechanisms of Atherosclerosis, in: *Frontiers in cardiovascular medicine* 5, 2018, S. 145, DOI: 10.3389/fcvm.2018.00145.

Leisegang, MS et al.: Pleiotropic effects of laminar flow and statins depend on the Krüppel-like factor-induced lncRNA MANTIS, in: *European heart journal*, 2019, DOI: 10.1093/eurheartj/ehz393.

Leisegang, MS et al.: Long Noncoding RNA MANTIS Facilitates Endothelial Angiogenic Function, in: *Circulation* 136 (1), 2017, S. 65-79, DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.026991.

Lucas, T et al.: RNA Therapeutics in Cardiovascular Disease, in: *Circulation research* 123 (2), 2018, S. 205-220, DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311311.

Michalik, K et al.: Long noncoding RNA MALAT1 regulates endothelial cell function and vessel growth, in: *Circulation research* 114 (9), 2014, S. 1389-1397, DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.303265.

und miR-126 hemmen den Prozess, während miR-21, miR-29 und miR-92a ihn zu fördern scheinen (Lucas et al., 2018).

Auch im Bereich der lncRNAs gibt es tierexperimentell bereits einige ermutigende Befunde. Hemmung der lncRNAs Chast und Meg3 wirken negativen Umbauprozessen im erkrankten Herzen entgegen. Eine Hemmung der lncRNA lincRNA-p21 reduzierte im Mausmodell das Gefäßwachstum nach Verletzung.

Auf dem Weg zu epigenetischen Therapien

Die Wissenschaftler des Cardio-Pulmonary Institute (CPI) beschäftigen sich intensiv mit der Rolle der Epigenetik in Erkrankungen des kardiopulmonalen Systems. Unter anderem identifizierten sie die Funktion verschiedener Histon-Deazetylasen und Demethylasen in Herzmuskel- und Endothelzellen. Endothelzellen kleiden Blutgefäße aus und sind damit essenziell für vaskuläre Reparaturprozesse und die Angiogenese. Im CPI wurde ebenfalls erstmals die Rolle von RNA-Editing, d. h. der gezielten chemischen Modifikation von RNAs, im Gefäßsystem beschrieben. Viele epigenetisch bedeutsame RNAs wurden identifiziert und charakterisiert, darunter auch die erst kürzlich entdeckten zirkulären RNAs (Boeckel et al., 2015) und die bereits erwähnten lncRNAs. Diese werden seit Juni dieses Jahres von Frankfurter Forschern aus dem CPI auch im Rahmen des Transregio-Sonderforschungsbereichs »Non-coding RNAs im Herz-Kreislauf-System« zusammen mit der TU München vertiefend untersucht.

Grundsätzlich werden an neue Therapeutika – zu Recht – sehr hohe Anforderungen in Hinblick auf Sicherheit und Wirksamkeit gestellt. Herz-Kreislauf-Erkrankungen verlaufen häufig chronisch; die lange Therapiedauer bzw. die lange Lebenserwartung unter bzw. nach einer Therapie bringen besondere Herausforderungen für die Sicherheit mit sich. Vor diesem Hintergrund scheinen Substanzen, die Histon-Modifikationen oder DNA-Methylierung beeinflussen, aufgrund ihrer systemischen Wirkung therapeutisch nicht ideal.

RNAs sind dagegen als Zielstrukturen deutlich attraktiver: Viele dieser Moleküle sind zellspezifisch exprimiert und zumindest hypothetisch besteht die Möglichkeit, mit spezifischen Applikationstechniken RNAs gezielt in einzelnen Geweben und Zellen zu beeinflussen. »RNA-Therapeutika« werden z. B. gegenwärtig entwickelt für Gefäßerkrankungen des Auges und erbliche Muskeldystrophie, die auch zur Herzschwäche führt (Lucas et al., 2018). ●



Der Autor

Prof. Dr. Ralf Brandes, 50, studierte Medizin an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) und der Emory University in Atlanta, USA.

Nach Promotion und Arzt im Praktikum in der Abteilung Kardiologie der MHH kam er 1997 mit einem Stipendium der Adumed-Stiftung nach Frankfurt, um unter der Leitung von Prof. Rudi Busse als Postdoc zu den physiologischen Funktionen von Sauerstoffradikalen zu forschen. Seit 2008 leitet Prof. Brandes das Institut für Kardiovaskuläre Physiologie. Er ist der Frankfurter Koordinator des Bereichs »Interorgan-Communication« im Exzellenzcluster CPI, stellvertretender Sprecher des DFG-Sonderforschungsbereichs 815 »Redox-Regulation: Generatorsysteme und funktionelle Konsequenzen« und Leiter des SFB-integrierten Graduiertenkollegs.

r.brandes@em.uni-frankfurt.de
www.vrc.uni-frankfurt.de