

# Die Bedeutung parakrin freigesetzter Zytokine adulter kardialer Progenitorzellen für das Remodeling des insuffizienten Herzens

---

**Friederike Dülfer**



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*   
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition linguistique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. R. Gerstberger  
und  
dem Physiologischen Institut  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuerin: Prof. Dr. S. Wenzel

Die Bedeutung parakrin freigesetzter Zytokine  
adulter kardialer Progenitorzellen für das Remodeling  
des insuffizienten Herzens

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Friederike Dülfer**  
Tierärztin aus Münzenberg

Gießen 2017

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

GutachterIn: Prof. Dr. R. Gerstberger  
Prof. Dr. S. Wenzel

Tag der Disputation: 19.10.2017

Am Ende wird alles gut.

Wenn es nicht gut wird, ist es noch nicht das Ende.

Oscar Wilde

Für meine Eltern, Bernd und Beate, Großmutter und Metin

## Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	VIII
1 EINLEITUNG .....	1
1.1 HERZINSUFFIZIENZ.....	1
1.1.1 <i>Herzerkrankungen der Haustiere</i> .....	3
1.2 STAMMZELLEN.....	5
1.3 KARDIALE PROGENITORZELLEN .....	5
1.4 ZYTOKINE.....	6
1.4.1 <i>Interleukin-6</i> .....	7
1.4.2 <i>Interleukin-8</i> .....	8
1.4.3 <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> .....	9
1.4.4 <i>Growth differentiation factor-15</i> .....	9
1.4.5 <i>Tissue inhibitor of metalloproteinases-1</i> .....	10
1.5 PARAKRINE EFFEKTE DURCH ZYTOKINE .....	11
1.6 KARDIOMYOZYTEN .....	14
1.7 AUFGABENSTELLUNG .....	17
2 MATERIAL.....	18
2.1 CHEMIKALIEN.....	18
2.2 PUFFER, LÖSUNGEN UND MEDIEN .....	20
2.2.1 <i>Zellverkürzung</i> .....	20
2.2.2 <i>Zellkultur</i> .....	21
2.2.3 <i>Western Blot</i> .....	22
2.2.4 <i>ELISA</i> .....	23
2.3 ZYTOKINE, ANTIKÖRPER UND siRNA .....	23
2.3.1 <i>Zytokine</i> .....	23
2.3.2 <i>siRNA</i> .....	23
2.3.3 <i>Antikörper</i> .....	24
2.3.4 <i>ELISA</i> .....	24
2.4 GERÄTE, GEBRAUCHSGEGENSTÄNDE UND SOFTWARE .....	24
2.4.1 <i>Allgemein</i> .....	24
2.4.2 <i>Myozytenpräparation</i> .....	25
2.4.3 <i>Myozytenisolierung</i> .....	25
2.4.4 <i>Zellverkürzung</i> .....	25
2.4.5 <i>Western Blot</i> .....	26
2.4.6 <i>Zellkultur</i> .....	26
2.4.7 <i>ELISA</i> .....	26
3 METHODEN .....	27
3.1 ZELLVERKÜRZUNG .....	27
3.1.1 <i>Gewinnung adulter ventrikulärer Kardiomyozyten aus dem Rattenherz</i> .....	27
3.1.2 <i>Kultivierung und Inkubation der isolierten Kardiomyozyten</i> .....	29
3.1.3 <i>Zellverkürzungsmessung</i> .....	34
3.1.4 <i>Isolierung der Kardiomyozyten für die Western Blot Analyse</i> .....	37
3.2 KULTIVIERUNG VON PROGENITORZELLEN AUS HERZGEWEBE .....	37
3.2.1 <i>Gewinnung myokardialer Progenitorzellen</i> .....	37
3.2.2 <i>Anlegen primärer Zellkulturen aus kardialem Gewebe</i> .....	38
3.2.3 <i>Etablierung der Progenitorzellkulturen</i> .....	39
3.2.4 <i>Gewinnung der Überstände und Zellen für Western Blot Analysen</i> .....	41
3.2.5 <i>Transfektion der Zellen mit short-interfering RNA</i> .....	41

3.2.6	<i>Stimulation der Zellkultur mit Zytokinen</i> .....	44
3.3	WESTERN BLOT ANALYSE.....	45
3.3.1	<i>SDS-haltige Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</i> .....	45
3.3.2	<i>Blotting der Proteine auf Membranen</i> .....	46
3.3.3	<i>Immunologischer Nachweis</i> .....	46
3.3.4	<i>Auswertung der Western blots</i> .....	47
3.4	ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA).....	48
4	ERGEBNISSE .....	50
4.1	WIRKUNG EINZELNER ZYTOKINE AUF ISOLIERTE KARDIOMYOZYTEN NORMOTENSI-VER RATTEN.....	50
4.1.1	<i>Interleukin-6</i> .....	51
4.1.2	<i>Interleukin-8</i> .....	52
4.1.3	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> .....	53
4.1.4	<i>Growth and differentiation factor-15</i> .....	54
4.1.5	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases-1</i> .....	55
4.2	SERCA / NCX EXPRESSIONSVERHÄLTNIS ISOLIERTER KARDIOMYOZYTEN NORMOTENSIVER RATTEN.....	56
4.2.1	<i>Interleukin-6</i> .....	57
4.2.2	<i>Interleukin-8</i> .....	58
4.2.3	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> .....	59
4.2.4	<i>Growth and differentiation factor-15</i> .....	60
4.2.5	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases-1</i> .....	61
4.3	WIRKUNG EINZELNER ZYTOKINE AUF ISOLIERTE KARDIOMYOZYTEN HYPERTENSIVER RATTEN .....	62
4.3.1	<i>Interleukin-6</i> .....	63
4.3.2	<i>Interleukin-8</i> .....	63
4.3.3	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> .....	64
4.3.4	<i>Growth and differentiation factor-15</i> .....	65
4.3.5	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases-1</i> .....	66
4.4	EINFLUSS VON ZYTOKINKOMBINATIONEN AUF DIE FUNKTION ISOLIERTER KARDIO-MYOZYTEN NORMOTENSIVER RATTEN .....	67
4.4.1	<i>Kontraktile Funktion bei „hohen Zytokinkonzentrationen“</i> .....	67
4.4.2	<i>SERCA / NCX Expressionsverhältnis bei „hohen Zytokinkonzentrationen“</i> .....	72
4.4.3	<i>Kontraktile Funktion bei „niedrigen Zytokinkonzentrationen“</i> .....	75
4.4.4	<i>SERCA / NCX Expressionsverhältnis bei „niedrigen Zytokinkonzentrationen“</i> .....	76
4.5	BLOCKADE DER ZYTOKINWIRKUNG AUF DIE KONTRAKTILE FUNKTION ISOLIERTER KARDIOMYOZYTEN DURCH BINDUNG AN ZYTOKINSPEZIFISCHE ANTIKÖRPER.....	78
4.6	WIRKUNG VON ZYTOKINZUGABEN ZU CPC-KULTUREN .....	82
4.7	REDUKTION DER IL-6 EXPRESSION HUMANER CPCs DURCH EINSATZ VON IL-6 SPEZIFISCHE SI-RNA .....	84
4.8	WIRKUNG HUMANER MIT SI-RNA GEGEN IL-6 BEHANDELTEN CPC-KULTURÜBERSTÄNDE AUF ISOLIERTE KARDIOMYOZYTEN .....	89
5	DISKUSSION .....	91
5.1	ZYTOKINE IM ALLGEMEINEN.....	91
5.2	ZYTOKINE IM SPEZIELLEN.....	91
5.2.1	<i>Interleukin-6</i> .....	91
5.2.2	<i>Interleukin-8</i> .....	94
5.2.3	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> .....	95
5.2.4	<i>Growth differentiation factor-15</i> .....	96
5.2.5	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases-1</i> .....	97
5.3	KOMBINATIONEN .....	99
5.4	DIE URSACHE DER GESTEIGERTEN KONTRAKTILEN FUNKTION – SERCA/NCX-VERHÄLTNIS .....	103
5.5	WESTERN BLOT ALS METHODE DER KALZIUMKANALBESTIMMUNG.....	105

5.6	ZYTOKINWIRKUNG AUF ISOLIERTE KARDIOMYOZYTEN HYPERTENSIVER RATTEN .....	106
5.7	VERGLEICHBARKEIT ISOLIERTE KARDIOMYOZYTEN UND MYOKARDKONTRAKTILITÄT .....	109
5.8	PROGENITORZELLKULTUREN .....	110
5.9	INHIBITION DER EXPRESSION VON IL-6 IN DEN PROGENITORZELLKULTUREN .....	113
6	ZUSAMMENFASSUNG .....	116
7	SUMMARY .....	118
8	LITERATURVERZEICHNIS .....	120
9	ERKLÄRUNG .....	137
10	DANKSAGUNG .....	138

## Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Einfaktorielle Varianzanalyse
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BCIP	4-Bromo-4-chloro-3-indolyphosphate p-toluidine salt
BFGF	Basic fibroblast growth factor
BSA	Bovines Serumalbumin (albumin fraction V)
CCT	Creatin-Carnithin-Medium
CHIEF	Canine heart failure international expert forum
C. m.	Conditioned medium
CPC	Cardiac progenitor cells (kardiale Progenitorzellen)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GDF	Growth differentiation factor
HRP	Horseradish peroxidase
IL	Interleukin
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
sIL-6R	löslicher IL-6 Rezeptor
IL-8R	Interleukin-8 Rezeptor
IU	International units
JLU	Justus-Liebig-Universität Gießen
HCl	Salzsäure
Hz	Hertz (1 Hz = 60/min)
kDa	Kilodalton
M	Molar
mA	Milliampere
MCP	Monocyte chemoattractant protein
MCP-1R	Monocyte chemoattractant protein-1 Rezeptor
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter

## Abkürzungsverzeichnis

MMP	Matrix-Metalloproteinase
mM	Millimol
mRNA	Messenger ribonucleic acid
ms	Millisekunde(n)
mV	Millivolt
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
N	Normal
NBT	Nitrotetrazolium blue chloride
NCX	Natrium-Kalzium-Austauscher
ng	Nanogramm
Nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NYHA	New York Heart Association
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
pg	Pikogramm
p. m.	Plain medium
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute
sek	Sekunde
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
SHR	Spontaneous hypertensive rat – spontan hypertensive Ratte
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF-β	Transforming growth factor-β
TIMP	Tissue inhibiting factor of metalloproteinases
TTBS	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween®
U	Umdrehungen
vor Tryp.	vor Trypsinierung
V	Volt

## Abkürzungsverzeichnis

VEGF	Vascular endothelial growth factor
Vol-%	Volumen-Prozent
W	Wistar-Ratte



### 1 Einleitung

Das Herz ist das zentrale Organ für die Blutzirkulation im Körper und ohne die Pumpfunktion dieses Hohlorgans ist der Körper nicht lebensfähig. Weltweit stellen kardiovaskuläre Erkrankungen mit 27,1% bei steigender Tendenz die Haupttodesursache des Menschen dar, wobei die meisten kardiovaskulär bedingten Todesfälle in den Industrienationen zu verzeichnen sind (WHO 2012). Die in Deutschland erhobenen Zahlen decken sich mit denen anderer Industrienationen: über 40% der im Jahr 2013 verstorbenen Menschen erlagen Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems (Statistisches Bundesamt 2013). Die Behandlungskosten kardiovaskulärer Erkrankungen beliefen sich im Jahr 2008 in Deutschland laut Statistischem Bundesamt auf 37 Milliarden Euro und haben damit eine hohe sozioökonomische Bedeutung.

#### 1.1 Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist definiert als „unzureichende Funktion des Herzens, bei der dieses nicht mehr imstande ist, eine den Anforderungen entsprechende Förderleistung zu erbringen“ (Pschyrembel 2013). Einer Herzinsuffizienz gehen unterschiedliche Herzerkrankungen voraus. Diese können im Allgemeinen zu einer Druck- und/oder Volumenbelastung des Herzens führen. Bis zum Stadium der klinischen Herzinsuffizienz hat der Körper bereits diverse Kompensationsmechanismen eingeleitet (Böhm and Bäumer 2000).

Trotz der Belastung durch eine Herzerkrankung versucht der Körper über verschiedene Mechanismen die erforderliche Pumpleistung des Herzens aufrecht zu halten. So kommt es primär zu einer Erhöhung des Sympathikotonus mit vermehrter Ausschüttung von Katecholaminen und damit - Betarezeptor-vermittelt - zu einer Steigerung der Herzfrequenz und Kontraktilität des Myokards. Die auf Gefäßebene induzierte Alpha-rezeptor-vermittelte Vasokonstriktion bedingt einen Anstieg des zentralen Blutdrucks (Schmidt et al. 2000). Reicht die Pumpleistung des Herzens nicht mehr aus, im physiologischen wie auch im pathologischen Fall, so kommt es zu einer geringeren Durchblutung der Nieren, wodurch wiederum das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS) aktiviert wird. Das aus dem Bereich der *Vasa afferentia* freigesetzte Enzym Renin spaltet Angiotensin I aus dem  $\alpha$ 2-Globulin Angiotensinogen ab, welches seinerseits durch das endotheliale Angiotensin-converting-Enzym (ACE) in Angiotensin II (AngII) umgewandelt wird. Das Oktapeptid AngII wirkt stark vasokonstriktorisch und steigert dadurch den Blutdruck. Desweiteren stimuliert es die Ausschüttung von

## Einleitung

adrenalem Aldosteron, was zu einer erhöhten Natrium- und Wasserretention in der Niere führt und so das Plasmavolumen erhöht (Dzau et al. 1988; Nishimura 2016; Reid et al. 1987). Die Folge ist eine Zunahme des Blutvolumens *per se* sowie des venösen Rückstroms zu den Vorhöfen des Herzens. Dieses vermehrte Volumen führt zum einen zur gesteigerten Füllung der Kammern und zum anderen zur verstärkten Dehnung der Herzmuskelfasern (= Kardiomyozyten). Dieser Effekt wird als erhöhte Vorlast bezeichnet und führt zur stärkeren Kontraktion mit größerem Schlagvolumen des Myokards (Engelhardt and Ahrens 2005).

Natriuretische Peptide wie ANP (atriales natriuretisches Peptid), BNP (brain natriuretic peptide) und CNP (C-type natriuretic peptide) werden unter anderem in den Kardiomyozyten der Vorhöfe bzw. der Kammern des Herzens gebildet und durch deren Dehnung ausgeschüttet. Sie hemmen die Sekretion von Renin, antidiuretischem Hormon (ADH) und Aldosteron und steigern dadurch die Natriurese und Diurese, was zur Verminderung der Vorlast führt (Siegenthaler and Blum 2006). Diuretische Peptide, vor allem ANP, steigern die renale Salz- und Wasserausscheidung vor allem durch Vasodilatation der *Vasa afferentia* und Hemmung der Natriumretention im distalen Tubulus (Christensen 1993; Fried et al. 1988).

Hält eine Dehnung der Vorhöfe und Kammern über eine längere Zeit an, so können eine Druckbelastung zur Hypertrophie und eine Volumenbelastung zur Dilatation des Herzens führen. Häufig kommt es zuerst zu einer Hypertrophie und anschließend zu einer Dilatation (Erdmann 2011). Die Anpassung des Herzens an veränderte Druck- und Volumenverhältnisse geschieht durch das sogenannte „Remodeling“. Es ist definiert als veränderte Genexpression, welche in molekularen, zellulären und interstitiellen Änderungen resultiert und sich in einer Größen- und Funktionsänderung des Herzens manifestiert. Das kardiale „Remodeling“ unterliegt hämodynamischen Einflüssen, neurohumoraler Aktivierung und weiteren Faktoren, die noch erforscht werden müssen (Cohn et al. 2000).

Eine Herzinsuffizienz ist klinisch erkennbar, geht mit einem Leistungsabfall einher und – je nach betroffener Herzseite – mit einem Rückstau in die Lunge (linkes Herz), beziehungsweise in den großen Kreislauf (rechtes Herz) (Siegenthaler and Blum 2006; Tobias et al. 2008). Es gibt unterschiedliche Kriterien und Skalen, mit denen eine Herzerkrankung klassifiziert werden kann. Im Folgenden wird mit dem weltweit standardisierten Schema der Einteilung von Herzkrankheiten nach Schweregraden der New York Heart Association (NYHA-Schema) gearbeitet. Sie beinhaltet vier Grade (Tab. 1) von Beschwerdefreiheit bis hin zu Beschwerden bereits in Ruhe, an welchen sich letztlich die Therapie orientiert (Siegenthaler and Blum 2006).

**Tabelle 1: NYHA-Klassifizierung der Symptome von Herzkrankheiten**

Bei der Einteilung der Herzkrankheiten mit dem Schema der New York Heart Association werden die Symptome des Patienten ermittelt und dieser dann in eine der vier verschiedenen Kategorien eingeteilt. Anhand dieser Kategorien orientiert sich die jeweilige Therapie des Patienten.

Stadium	Definition
NYHA I	Herzerkrankung ohne körperliche Limitation. Alltägliche körperliche Belastung verursacht keine inadäquate Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot.
NYHA II	Herzerkrankung mit leichter Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Alltägliche körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot.
NYHA III	Herzerkrankung mit höhergradiger Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit bei gewohnter Tätigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Geringe körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot.
NYHA IV	Herzerkrankung mit Beschwerden bei allen körperlichen Aktivitäten und in Ruhe. Bettlägerigkeit.

### 1.1.1 Herzerkrankungen der Haustiere

In den letzten Jahrzehnten haben Haustiere, allen voran Hund und Katze, in unserer Gesellschaft den Wandel vom nützlichen Tier in Haus und Hof zum Status eines Familienmitgliedes erfahren. Damit einher geht der Wille der Besitzer, ihre Tiere medizinisch bestmöglich versorgt zu sehen.

Etwa 10% der in der Tierarztpraxis vorgestellten Hunde haben ein Herzproblem, wobei davon 20% auf angeborene und 80% auf erworbene Herzfehler entfallen (Biller et al. 1998; Detweiler and Patterson 1965; Kohn et al. 2012). Bei Katzen verhält es sich ähnlich. So haben Bond et al. (1984) bei 12% der obduzierten Katzen eine hypertrophe Kardiomyopathie diagnostizieren können und Cote et al. (2004) fanden bei 21% der untersuchten Katzen Herzgeräusche.

Unter den kongenitalen Herzerkrankungen kommen die Subaortenstenose oder Pulmonalstenose, der Ventrikelseptumdefekt, der persistierende *Ductus arteriosus* Botalli

## Einleitung

und die Trikuspidaldysplasie am häufigsten vor. Die Mitralklappenendokardiose führt mit 50% der Herzerkrankungen beim Hund die Liste der erworbenen Herzerkrankungen an, gefolgt von der dilatativen Kardiomyopathie mit 21%, dem Perikarderguss mit 10% und Herzneoplasien mit 7% (Kohn et al. 2012). Im Gegensatz zum Menschen jedoch spielen ischämische Infarkte im Allgemeinen kaum, und Herzinfarkte im Speziellen keine Rolle (Van Vleet and Ferrans 1986; Williams 2003). Mit einer Prävalenz von 0,6% kommt bei der Katze eine Aortenthrombose vor, der meist eine Form der Kardiomyopathie zugrunde liegt (Dirven and Cornelissen 2009). Die Kardiomyopathien selbst sind denen des Menschen sehr ähnlich, kommen allerdings weniger häufig vor (Liu and Tilley 1980; Van Vleet and Ferrans 1986).

Die Einteilung der veterinärmedizinischen Herzerkrankungen erfolgte bisher nach dem humanmedizinischen NYHA-Schema (Tab. 1). Vor einigen Jahren wurde ein neues, modifiziertes Schema vorgestellt, welches heute weitestgehend in der Praxis Anwendung findet: Canine Heart Failure International Expert Forum, kurz CHIEF. Es berücksichtigt dabei auch Tiere, die noch keinerlei Herzerkrankungen aufweisen, aber das Risiko tragen, diese zu entwickeln (Malliaras et al. 2014).

Das ist wichtig, da sich aufgrund der Zucht auf spezielle Eigenschaften bei einigen Rassen typische Veränderungen im Genom der Linie manifestiert haben. Der Wunsch, ein Tier mit bestimmten Leistungskriterien oder optischen Merkmalen zu haben, erhöhte den Selektionsdruck so stark, dass durch Inzucht Rassen entstanden, die in der Wildbahn wohl kaum mehr überleben könnten (Gough and Thomas 2009). So liegt zum Beispiel die Prävalenz für eine dilatative Kardiomyopathie bei europäischen Dobermännern bei 58,2% und in manchen Boxer-Linien kommt die arhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) als autosomal dominanter Erbgang vor (Meurs et al. 1999; Wess et al. 2010). Bei der Maine Coon Katze konnte ein autosomal dominanter Erbgang für eine hypertrophe Kardiomyopathie identifiziert werden, für den es inzwischen einen Gentest gibt (Malliaras et al. 2014). Die Beispiele zeigen, dass das CHIEF-Schema, mit der Möglichkeit Risikopatienten mit einzuschließen, in der Tiermedizin notwendig ist, um solche Katzen von der Zucht auszuschließen.

Die Möglichkeiten der veterinärmedizinisch kardiologischen Diagnostik und Therapie, vor allem im Bereich der Kleintiermedizin sind in den letzten Jahren sprunghaft angestiegen. Häufig sind daher nicht mehr das Wissen oder die Technik limitierende Faktoren, sondern die finanziellen Möglichkeiten der Patientenbesitzer.

### 1.2 Stammzellen

Stammzellen sind definiert als undifferenzierte und unbegrenzt teilungsfähige Zellen (Peschyrembel 2013). Unter den Stammzellen gibt es Abstufungen der Differenzierungsfähigkeit. So ist die totipotente Stammzelle nur im frühen embryonalen Stadium vorzufinden und in der Lage, einen eigenständigen Organismus zu entwickeln (Deutsche Forschungsgemeinschaft 2010-2015). Pluripotente Stammzellen können in jegliche Körperzelle ausdifferenzieren, während multipotente Stammzellen fähig sind, eine Vielzahl von Abkömmlingen zu bilden, wie zum Beispiel die hämatopoetische Stammzelle (Quelle: DFG – Was sind Stammzellen?; Schmidt et al. 2000). Diese adulten Stammzellen, oder auch residente Progenitorzellen, sind teilungsfähig und bisher in vielen Organen des Körpers nachgewiesen (Quelle: DFG – Was sind Stammzellen?). Die Begriffe „Progenitorzellen“ und „adulte Stammzellen“ werden häufig nicht klar voneinander differenziert oder sogar simultan benutzt. Es sind klonogene, sich selbst erneuernde Zellen (Bearzi et al. 2007), die sich lebenslang in dem jeweiligen Organ aufhalten und sich in Zellen des Organs differenzieren können (Quelle: DFG – Was sind Stammzellen?).

### 1.3 Kardiale Progenitorzellen

Das adulte Herz galt lange als terminal differenziertes Organ, welches auf erhöhte Belastung nur in Form von Hypertrophie reagieren kann. Verschiedene Arbeitsgruppen haben diese These durch den Beweis der prinzipiellen Teilungsfähigkeit von Kardiomyozyten widerlegt (Soonpaa and Field 1998). Messina et al. (2004) gelang es, aus humanem Herzgewebe in der Zellkultur sich selbst erneuernde, klonogene Zellen zu isolieren. Dafür homogenisierten und kultivierten sie humanes und rattenspezifisches Herzgewebe. Nach Anheften des Gewebes am Boden der Zellkulturschale wuchsen aus ihnen fibroblastenähnliche Zellen, über die 20 - 150 Mikrometer ( $\mu\text{m}$ ) kleine, runde „phase-bright cells“ migrierten. Durch Zusammenlagerung dieser Zellen und Verwendung eines speziellen Mediums bildeten sich die von den Autoren als „Kardiosphären“ bezeichneten Strukturen. Die Kardiosphären von Ratten vermehrten sich stark, fingen spontan an zu kontrahieren und differenzierten sich *in vitro* - wie auch nach Transplantation *in vivo* - in Kardiomyozyten, glatte Muskelzellen und Endothelzellen.

Zur genaueren Identifikation der Zellen konnten Stammzellmarker wie c-kit (Stammzellfaktor-Rezeptor, Rezeptor-Tyrosinkinase), sca-1 (stem cell antigen-1, Stammzellmarker unter anderem kardialer Stammzellen) und isl-1 (ISL LIM homeobox 1, Trans-

## Einleitung

kriptionsfaktor) am embryonalen Herz nachgewiesen werden (Beltrami et al. 2003; Krehbiehl 2010; Laugwitz et al. 2005; Müller 2010; Oh et al. 2003, Wang et al. 2006). Gleichzeitig fanden sich keine Oberflächenmarker zytoplasmatischer Myozyten, glatter Muskelzellen und Endothelzellen (Beltrami et al. 2003). Diese Charakteristika zusammengenommen zeichnen Kardiosphären als mögliche Progenitorzellen aus, so dass Messina et al. (2004) sie als Klone adulter Stammzellen (im folgenden Progenitorzellen genannt) beschrieben. Mit zunehmender Charakterisierung wurden Substanzen wie Wachstumsfaktoren und Zytokine identifiziert, die von Progenitorzellen freigesetzt werden (Davis et al. 2010; Durdu et al. 2012; Fujio et al. 2011; Liu et al. 2014; Maxeiner et al. 2010).

Die Wissenschaft forscht inzwischen in zwei unterschiedliche Richtungen, um die Entdeckung kardialer Progenitorzellen und deren Bedeutung besser zu verstehen:

- 1) Studien, welche die Applikation autologer kardialer Progenitorzellen im Tier wie auch im Menschen untersuchen (Bearzi et al. 2007; Bolli et al. 2011; Malliaras et al. 2014; Matsuura et al. 2004);
- 2) Die Untersuchung parakriner Aktivitäten kardialer Progenitorzellen (Chimenti et al. 2010; Michler 2013; Pagliari et al. 2013).

Heute herrscht Konsens, dass Progenitorzellen therapeutisches Potential haben. Die von ihnen sezernierten Zytokine induzieren die Angiogenese, reduzieren die Narbengröße nach einem Myokardinfarkt und fördern die kardiale Regeneration (Chimenti et al. 2010; Durdu et al. 2012; Jezierska-Wozniak et al. 2011; Malliaras et al. 2014).

### **1.4 Zytokine**

Zytokine sind 10-25 Kilodalton (kDa) kleine Proteine, die pro- bzw. anti-inflammatorische, immunmodulatorische und chemotaktische Funktionen haben (Siegenthaler and Blum 2006). Sie regulieren grundlegende Prozesse wie Wachstum, Differenzierung und Zellfunktion und vermitteln ihre Wirkung meist parakrin oder autokrin und in einigen Fällen sogar endokrin (Zu Eulenburg, 2007). Die Halbwertszeit von Zytokinen ist sehr kurz; so liegt sie zum Beispiel bei Interleukin-6 (IL-6) im Bereich von wenigen Minuten (Schneider 2014). Zytokine binden an der Zelloberfläche an spezifische Rezeptoren und lösen eine intrazelluläre Signaltransduktion über Janus-Kinasen aus, welche wiederum Transkriptionsfaktoren der „transducers and activators of transcription (STATs)“-Familie aktivieren, die dann jeweils als Dimere in den Zellkern migrieren und dort die Genexpression beeinflussen (Springuel et al. 2015).

## Einleitung

Die Einteilung von Zytokinen ist sehr heterogen und unterliegt dem ständigen Wandel, da laufend neue Wirkungsweisen der einzelnen Zytokine entdeckt werden. Eine mögliche Einteilung ist die in funktionelle Klassen, woraus sich folgende Gruppen ergeben: Interleukine, Chemokine, Interferone und Wachstumsfaktoren (Kafke et al. 2011).

In der Regel sind mehrere Zelltypen in der Lage, ein bestimmtes Zytokin zu bilden, und eine bestimmte Wirkung kann ihrerseits von mehreren Zytokinen erzielt werden (Redundanz). Zudem kann ein Zytokin diverse Funktionen aufweisen. Ein Zytokin wirkt selten allein sondern meist im Zusammenspiel mit anderen (Moraga et al. 2014). Sie können dann als Agonisten und Antagonisten, wie auch supprimierend oder induzierend auf andere Zytokine wirken (Siegenthaler and Blum 2006). Die stete Entdeckung neuer Wirkungsmechanismen macht das definitive Einordnen eines Zytokins nicht leicht und die genannten Eigenschaften führen häufig zu widersprüchlichen Ergebnissen, je nachdem in welcher Funktion ein Zytokin betrachtet wird.

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Wenzel/Maxeiner beschäftigten sich mit der Wirkung löslicher Mediatoren kardialer Progenitorzellkulturen (CPC-Kulturen) auf isolierte Kardiomyozyten. Es stellte sich heraus, dass die konditionierten Überstände von CPC-Kulturen einen hochgradig stimulierenden Effekt auf die kontraktile Funktion isolierter Kardiomyozyten haben (Krehbiehl 2010; Maxeiner et al. 2010; Müller 2010). Um die Ursache für diesen Effekt zu identifizieren, wurde die Zusammensetzung der Überstände unter anderem mit Hilfe von Zytokinarrays untersucht. In den besonders potenten Überständen waren vermehrt IL-6, Interleukin-8 (IL-8), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), growth differentiation factor-15 (GDF-15) und tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) vorhanden (Krehbiehl 2010; Maxeiner et al. 2010).

### 1.4.1 Interleukin-6

IL-6 vermittelt seine Wirkung über einen membranständigen IL-6 Rezeptor (IL-6R). Darüber hinaus kann IL-6 seine Wirkung auch über einen löslichen IL-6 Rezeptor (sIL-6R) vermitteln, welcher aus der extrazellulären Domäne des IL-6R besteht und das freie IL-6 bindet (Rose-John 2012). In beiden Fällen beginnt die intrazelluläre Signalt-ransduktion mit der Aktivierung des Glykoproteins GP 130, welches letztlich STAT-vermittelt die Genexpression beeinflusst (Janeway and Travers 1997). IL-6 als proinflammatorisches Zytokin und dessen Wirkung wird am Herz bereits seit langem untersucht. Erhöhte Plasmaspiegel sind beim Menschen mit Herzinsuffizienz nachgewiesen, so dass IL-6 in Zukunft als Biomarker für die Früherkennung einer Herzerkrankung

## Einleitung

kung fungieren könnte (Gullestad et al. 2012; Iqbal et al. 2013). Kardiomyozyten exprimieren den IL-6-Rezeptor (IL-6R) und erhöhte IL-6 Konzentrationen sind im Myokard bereits eine Stunde nach einem Infarkt detektierbar (Fuchs et al. 2003; Gwechenberger et al. 1999; Maxeiner et al. 2014). Ebenso weisen Kardiomyozyten am Rande des Infarktgebietes entsprechend erhöhte IL-6 Konzentrationen auf und die Neutralisation von IL-6 durch Antikörper führt zur schlechteren Wundheilung des ischämischen Gewebes (Ghigo et al. 2014; Kobara et al. 2010). Das Zytokin IL-6 spielt also eine Schlüsselrolle im Rahmen der inflammatorischen Antwort auf einen Myokardinfarkt und hat einen großen Einfluss auf das linksventrikuläre „Remodeling“ des erkrankten Herzens (Ghigo et al. 2014; Huang et al. 2014; Melendez et al. 2010).

### 1.4.2 Interleukin-8

IL-8 oder auch CXCL-8 gehört zur Gruppe der CXC-Chemokine und stellt einen der potentesten chemotaktischen Faktoren für neutrophile Granulozyten dar, um deren Diapedese aus den Blutgefäßen an den Ort des Insultes zu bewirken (Frangogiannis 2004b; Heinrich et al. 2012; Janeway and Travers 1997; Ren et al. 2003). IL-8 vermittelt seine Wirkung über CXCR1 und CXCR2, zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Siegenthaler and Blum 2006), welche eine Signalkaskade auslösen, bei der es zur Aktivierung unterschiedlicher G-Proteine und in Folge dessen zur Beeinflussung der Aktinpolymerisation und damit zur Organisation des Zytoskeletts, zur Zellmigration oder zur intrazellulären Kalziumausschüttung kommt (Heinrich et al. 2012). IL-8 wird von Monozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen gebildet (Iqbal et al. 2013) und kann auch im Myokard nach einem Infarkt in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen werden (Frangogiannis 2004b; Tonnessen et al. 2003; Wan and Yim 1999). Nicht nur dort nimmt es eine zentrale Rolle in der Angiogenese ein (Heinrich et al. 2012; Jezierska-Wozniak et al. 2011). Zusammen mit Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs) interagiert IL-8 mit dem Koagulationssystem (Elmas et al. 2007).

In Bezug auf das Herz können erhöhte IL-8 Konzentrationen im Serum von Menschen nach einem Myokardinfarkt nachgewiesen werden, welche mit den erhöhten Konzentrationen an kardialem Troponin-I – einem hochspezifischen Marker kardialer Insulte – korrelieren (Abe et al. 1993; Wan and Yim 1999). Nymo et al. (2014) stellen eine direkte Verbindung der IL-8 Konzentration mit dem klinischen „outcome“ eines Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz dar.

## Einleitung

Die Ratte als Versuchsorganismus besitzt ein IL-8 Äquivalent (Seino et al. 1995), welches sowohl strukturell als auch funktionell dem humanen IL-8 homolog ist (Himi et al. 1997). Bei der Maus ist dies noch nicht abschließend geklärt.

### 1.4.3 Monocyte chemoattractant protein-1

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), auch CC-Chemokinligand-2 (CCL2) genannt, gehört zur Klasse der Chemokine und fördert in erster Linie die Migration von Monozyten aus dem Gefäßsystem ins Gewebe sowie deren anschließende Ausreifung zu Gewebsmakrophagen (de Lemos et al. 2003; Janeway and Travers 1997). Im Herz wird MCP-1 von Leukozyten, Endothelzellen und Kardiomyozyten im Infarktgebiet gebildet und ist an dessen Neovaskularisation beteiligt (Cavalera and Frangogiannis 2014; Morimoto et al. 2006). Das chemotaktisch wirksame Protein spielt im erkrankten Herz eine wichtige Rolle, so dass viele Untersuchungen über dessen weitere Wirkungsmechanismen vorliegen. Viele Studien weisen erhöhte MCP-1 Konzentrationen im Plasma wie auch im Gewebe auf mRNA- und Proteinebene herzkranker Menschen im Anschluss an einen Myokardinfarkt auf (de Lemos et al. 2003; Frangogiannis 2004b; Guo et al. 2013; Tonnessen et al. 2003). Erhöhte MCP-1 Konzentrationen hemmen die Expression anderer Zytokine im Herzen und spielen eine entscheidende Funktion im „Remodeling“ des insuffizienten Herzens. Eine Überproduktion von MCP-1 im Infarktgebiet lässt vermuten, dass es zur Prävention einer linksventrikulären Dysfunktion und Heilung des Infarktgewebes beiträgt (Cavalera and Frangogiannis 2014; Frangogiannis 2004 a,b; de Lemos et al. 2003; Frangogiannis and Entman 2005; Ghigo et al. 2014; Morimoto et al. 2006).

### 1.4.4 Growth differentiation factor-15

Der growth differentiation factor-15 (GDF-15) gehört zur Superfamilie der „transforming growth factors- $\beta$ “ (TGF- $\beta$ ), wie auch das BMP (bone morphogenetic protein), die Activine und Inhibine. GDF-15 wird ubiquitär in vielen Geweben und Zellen des Körpers, unter anderem in Makrophagen und dem Herz, synthetisiert und bei Entzündungsreaktionen und akuten Gewebsverletzungen hochreguliert (Janeway and Travers 1997; Meier 2014; Wang 2014). Die Bindung an den GDF-15 spezifischen Oberflächenrezeptor führt zur Phosphorylierung der SMAD-Signaltransduktionsproteine (small body size mother against decapentaplegic). Dabei handelt es sich um intrazelluläre, zur TGF- $\beta$  Superfamilie gehörende Transkriptionsfaktoren; GDF-15 bindet spe-

## Einleitung

ziell an SMAD-2 und -3. Translokation des Signaltransduktionskomplexes in den Zellkern führt zur Aktivierung oder Inhibition der Gentranskription (Xu et al. 2006). Durch die genannten Faktoren können bei gleichbleibender Struktur und Quantität unterschiedliche, teilweise sogar antagonistische Effekte erzielt werden (Baumgärtner 2015).

Die Wirkung von GDF-15 am Herz wurde bis *dato* intensiv untersucht und es hat sich herausgestellt, dass es im gesunden Herz nicht exprimiert wird (Xu et al. 2006). Es gilt jedoch heute als wichtiger prognostischer Marker für Herzerkrankungen und korreliert gut mit der Entwicklung des ungünstigen dilatativen „Remodeling“ (Blankesteyn and Altara 2014; Iqbal et al. 2013; Schopfer et al. 2014). Es supprimiert die inflammatorische Antwort nach einem Myokardinfarkt und ist in diesem Gewebe signifikant heraufreguliert (Blankesteyn and Altara 2014; Cavalera and Frangogiannis 2014; Frangogiannis 2012). Auch bei anderen chronischen Herzerkrankungen, wie einer dilatativen Kardiomyopathie, sind erhöhte zirkulierende GDF-15 Konzentrationen detektierbar (Kempf et al. 2007; Xu et al. 2006). Letztere beschreiben GDF-15 als regulatorischen Faktor im Herzen, welcher die hypertrophe Reaktion dieses Organs verhindert. Diese Wirkung stellen auch andere Arbeitsgruppen fest und postulieren, GDF-15 wirke vor ischämischen Insulten und deren Reperfusionsschäden schützend auf das Herz ein (Bolli et al. 2011; Kempf et al. 2007; Liu et al. 2013). Bei der Untersuchung von GDF-15 knockout-Mäusen ist eine deutlich erhöhte Zahl von Herzrupturen nach einem Myokardinfarkt nachweisbar (Kempf et al. 2011).

### 1.4.5 Tissue inhibitor of metalloproteinases-1

Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) sind keine klassischen Zytokine, sondern repräsentieren die natürlichen endogenen Inhibitoren der Matrix-Metalloproteasen (MMPs), wobei sie an die katalytische Domäne der MMPs binden und diese effektiv hemmen. Im Allgemeinen zeigen TIMPs keine Spezifität für bestimmte MMPs, mit Ausnahme von TIMP-1 und TIMP-2, welche MMP-2 und MMP-9 als Zielstrukturen präferieren (Gupta 2012). MMPs und TIMPs sind wichtige Faktoren für den ständigen Umbau- und Anpassungsprozess der extrazellulären Matrix (Baumgärtner 2015). Vor allem MMP-9 und TIMP-1 wirken antagonistisch zueinander, so dass die Überwachung der Serumkonzentrationen und vor allem deren Verhältnis zueinander von besonderem Interesse ist; es steigt beim Risiko einer Herzerkrankung bereits sehr früh und wird bei einer hypertensiven Herzerkrankung abgesenkt (Collier et al. 2011; Foronjy et al. 2008). TIMP-1 stimuliert die kardiale

## Einleitung

Fibroblastenproliferation; daher ist es ein guter Marker für die Fibroseentstehung im Verlauf einer Hypertension und kann direkt mit dem „Remodeling“ in Verbindung gesetzt werden (Heymans et al. 2005; Lindsay et al. 2002; Lovelock et al. 2005; Vanhoutte et al. 2006; Weir et al. 2011).

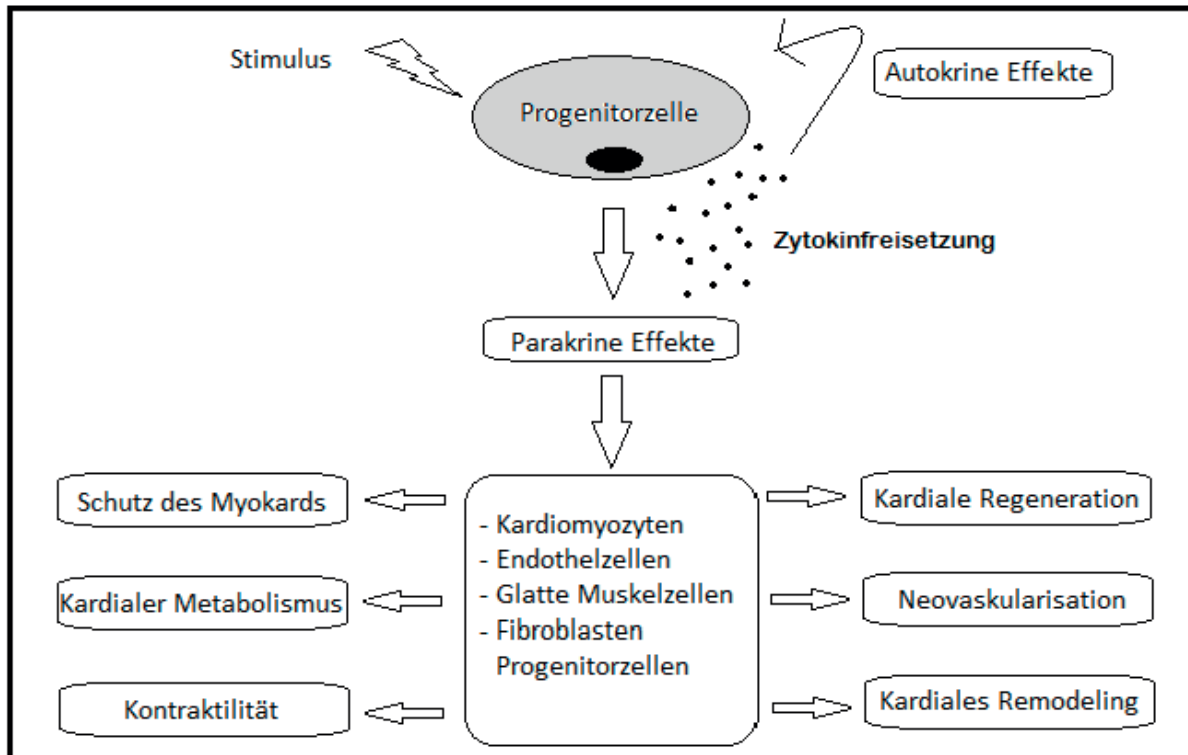
Die TIMP-1 Konzentration ist mit der linksventrikulären Masse und der Wanddicke des Myokards assoziiert und spielt eine Rolle bei der ventrikulären Dysfunktion (Hansson et al. 2009; Kang et al. 2008; Lindsay et al. 2002; Sundstrom et al. 2004; Tayebjee et al. 2004). Creemers et al. (2003) konnten zeigen, dass TIMP-1 knockout Mäuse, welche infolge der Gendefizienz Veränderungen der linksventrikulären Geometrie und Funktion aufweisen, auch eine verminderte Kontraktionsfunktion haben. Die gezielte Untersuchung von TIMP-1 bis TIMP-4 in anderen Arbeiten zeigt bei verschiedener Kombination dieser TIMPs eine Suppression der Kardiomyozyten-Apoptose; für TIMP-1 und TIMP-3 sind *in vitro* kardioprotektive Effekte nachgewiesen (Uchinaka et al. 2014).

### 1.5 Parakrine Effekte durch Zytokine

Vom Körper produzierte Signalmoleküle, wie Zytokine, vermitteln ihre Wirkung auf Zellen, Gewebe und Organe auf drei verschiedenen Wegen: autokrin, parakrin und endokrin (zu Eulenburg 2007). Bei der autokrinen Wirkung sezerniert eine Zelle ein Produkt, welches nach der Freisetzung an zelleigene Rezeptoren bindet und diese Zelle selbst beeinflusst. Die parakrine Wirkung findet lokal statt: produzierte und freigesetzte Produkte einer Zelle wirken auf die Zellen in der Umgebung und das umliegende Gewebe. Die endokrine Wirkung zeichnet sich durch die Möglichkeit aus, entfernt liegende Organe und Gewebe zu erreichen: von Zellen sezernierte Mediatoren werden ins Blut entlassen und so an entfernte Orte gebracht, um dort ihre Wirkung zu vermitteln (Prabhu et al. 2004).

Progenitorzellen vermitteln ihre Wirkung in der Regel parakrin und/oder autokrin über die Bildung und Freisetzung von Mediatoren (Gnecchi et al. 2008; Pagliari et al. 2013; Prabhu et al. 2004; Zamilpa et al. 2014). Auch die Aktivierung residenter Progenitorzellen durch parakrine Faktoren ist beschrieben (Jeziarska-Wozniak et al. 2011).

## Einleitung



**Abbildung 1: Parakrine Wirkung von Progenitorzellen**

Progenitorzellen sezernieren auf einen Stimulus hin Mediatoren, welche autokrin oder auch parakrin wirken. Die parakrine Wirkung beeinflusst im Herzen Kardiomyozyten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten und andere Progenitorzellen. Diese antworten mit den jeweils unterschiedlichen Anpassungsstrategien. Quelle: Modifiziert nach Gneccchi et al. 2008.

Auf einen Stimulus, wie zum Beispiel Hypoxie oder die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren (Gneccchi et al. 2005; Linke et al. 2005) produzieren kardiale Progenitorzellen Zytokine, welche dann, wie beschrieben, durch autokrine Mechanismen sich selbst oder durch parakrine Mechanismen unmittelbar benachbarte Zellen beeinflussen. Im Herzen sind dies Kardiomyozyten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten oder aber auch andere Progenitorzellen. Die jeweiligen Zellen üben dann ihrerseits eine Wirkung auf das Herz aus, welche sich in die sechs folgenden Kategorien einteilen lässt: 1) myokardiale Protektion, 2) kardialer Metabolismus, 3) Kontraktilität, 4) kardiale Regeneration, 5) Neovaskularisation und 6) kardiales „Remodeling“ (Gneccchi et al. 2008).

- 1) Myokardiale Protektion: Verschiedene Arbeitsgruppen setzten sich mit der parakrinen Wirkung sezernierter Stoffe mesenchymaler Stammzellen auseinander. Diese Mediatoren haben eine direkte zytoprotektive Wirkung auf ischämische Kardiomyozyten und hemmen die Apoptose nach einem Myokard-

## Einleitung

- infarkt, was zu einer Reduktion des Zelluntergangs führt (Chimenti et al. 2010; Gneccchi et al. 2005, 2008; Uemura et al. 2006).
- 2) Kardialer Metabolismus: Feygin et al. (2007) untersuchten die Randzone des Myokardinfarktes bei Schweinen mit und ohne Transplantation von mesenchymalen Stammzellen und konnten demonstrieren, dass die transplantierten Tiere einen deutlich reduzierten Wandstress und eine sehr deutliche bioenergetische Verbesserung aufwiesen.
  - 3) Kontraktilität: Die Inkubation isolierter Kardiomyozyten mit konditionierten Überständen kardialer Progenitorzellen führte zu einer signifikanten Steigerung der kontraktilen Funktion (Maxeiner et al. 2010). Andere Arbeitsgruppen folgerten aus Kontraktionsmessungen an Kardiomyozyten, dass Stammzellen positiv inotrope Faktoren freisetzen (Gneccchi et al. 2008). In den oben bereits genannten Versuchen von Feygin et al. (2007) wiesen die Schweine nach dem Myokardinfarkt eine relevante Verbesserung der myokardialen Kontraktion auf, wenn sie vorher mesenchymale Stammzellen transplantiert bekamen.
  - 4) Kardiale Regeneration: Wurden Progenitorzellen in verletztes Myokard injiziert, so proliferierten und differenzierten sie in Kardiomyozyten oder fusionierten mit Kardiomyozyten, wodurch das untergegangene Myokard regenerierte (Dimmeler et al. 2005). Den Beweis für die Regenerationsfähigkeit durch parakrine Interaktionen sehen Amado et al. (2005) in der deutlichen Reduktion des nekrotischen Myokards und der Bildung neuer, kontraktiler Kardiomyozyten an der Grenze des Myokardinfarktes. Chimenti et al. (2010) beschrieben die parakrinen Effekte durch die Stimulation endogener Reparationsmechanismen.
  - 5) Neovaskularisation: Die parakrine Wirkung von Progenitorzellen auf die Neovaskularisation durch Proangiogenesefaktoren wurde vielfach beschrieben und scheint einen Schlüsselmechanismus zur Regeneration des Myokards darzustellen (Chimenti et al. 2010; Jezierska-Wozniak et al. 2011; Segers et al. 2007; Wang et al. 2006). Einzelne parakrin wirkende Zytokine, wie der vascular endothelial growth factor (VEGF), wurden für diese Effekte verantwortlich gemacht (Chimenti et al. 2010; Ohnishi et al. 2007; Wang et al. 2006).
  - 6) Kardiales „Remodeling“: Das „Remodeling“ des Herzens als Anpassungsreaktion auf erhöhte Belastungen erfolgt maßgeblich durch einen Umbau der extrazellulären Matrix. Ohnishi et al. (2007b) entdeckten eine Reihe von Mediatoren, die von mesenchymalen Stammzellen sezerniert werden, welche die Biogenese der extrazellulären Matrixkomponenten wie etwa Kollagen oder MMPs beeinflussen. Die sezernierten Moleküle inhibieren die kardiale Expression von

## Einleitung

Kollagen Typ I und III, TIMP-1 und TGF- $\beta$  und hemmen so die Fibrose durch parakrine Interaktionen. Es kam zum günstigen „Remodeling“ des Herzens und zu einer verbesserten Narbenheilung eines Infarktes (Gnecchi et al. 2008).

Jahre der Forschung an Progenitorzellen haben keine Zweifel daran gelassen, dass diese Mediatoren exprimieren, welche Reparaturmechanismen fördern (Michler 2013). Auch der parakrine Weg der Signalübermittlung gilt heute als wissenschaftlich gesichert (Jeziarska-Wozniak et al. 2011). Die freigesetzten Zytokine beeinflussen die Mikroumgebung der Progenitorzellen und tragen so zur Physiologie aber auch zur Pathologie benachbarter Zellen bei (Gnecchi et al. 2008).

### 1.6 Kardiomyozyten

Das Herz stellt einen großen Hohlmuskel dar. Spezialisierte Kardiomyozyten, sogenannte Schrittmacherzellen im Sinus- und AV-Knoten, sind in der Lage, elektrische Potentiale zu generieren. Die einzelnen Kardiomyozyten sind über Glanzstreifen und gap junctions mit den jeweils benachbarten Kardiomyozyten verbunden; daraus ergibt sich die elektrische Kopplung des Herzens. Diese besondere Funktion ermöglicht es dem Myokard, das selbst generierte Aktionspotential fortzuleiten und, ohne auf einen Reiz des Nervensystems angewiesen zu sein, als funktionelle Einheit zu agieren (Campbell et al. 2009).

Eine Kardiomyozyte des Arbeitsmyokards hat eine zylindrische Form und ist etwa 60 - 100  $\mu\text{m}$  lang und 10 - 20  $\mu\text{m}$  breit mit zentralem länglichen Kern (Baumgärtner 2015). Es gibt im adulten humanen Herzen etwa vier bis fünf Milliarden Kardiomyozyten (Frangogiannis 2012). Die Umgebung der Zellen stellt das Interstitium dar, welches Blut- und Lymphgefäße, Nerven und Bindegewebe, Progenitorzellen und Bausteine der extrazellulären Matrix enthält (Baumgärtner 2015).

Die Erregung des Herzens entsteht im Sinusknoten und breitet sich von der Basis bis zur Spitze über das Herz aus. Der grundsätzliche Erregungsablauf ist in jeder Kardiomyozyte des Herzens gleich und teilt sich in unterschiedliche Phasen ein. Im unerregten Zustand herrscht an der Membran der Herzmuskelzelle (Sarkolemm) ein Ruhemembranpotential von etwa -80 mV. Trifft eine Erregung ein, so kommt es zu einem Natriumeinstrom (Depolarisation) durch spannungsabhängige Natriumkanäle mit nachfolgender Aktivierung langsamer Kalziumkanäle vom L-Typ, die einen langanhaltenden Kalziumeinstrom bewirken (Plateauphase). Dieser löst dann die sogenannte Kalzium-induzierte Kalziumfreisetzung aus dem *sarkoplasmatischen Retikulum* aus

## Einleitung

und die Kontraktion der Muskelzelle erfolgt. Der sich anschließende Kaliumausstrom leitet die Repolarisation der Membran ein, welche zur Wiederherstellung des Ruhemembranpotentials führt (Quentin 2009).

Die Kalzium-induzierte Kalziumfreisetzung aus dem *sarkoplasmatischen Retikulum* erfolgt über Ryanodinrezeptoren, woraus letztlich der wesentlich größere Anteil an Kalziumionen der Zelle stammt. Durch das Zusammenspiel von extrazellulärem und sarkoplasmatischem Kalzium steigt die Konzentration im Zytosol sehr schnell an (Kalziumtransient) und hält sich - im Vergleich zum Skelettmuskel - länger auf hohem Niveau. Das intern freigesetzte Kalzium wiederum hemmt den extrazellulären Kalziumeinstrom. Stärke und Dauer der Kontraktion werden durch Größe und Dauer des Aktionspotentials wie auch des Kalziumtransienten bestimmt. Je mehr Kalzium im *sarkoplasmatischen Retikulum* gespeichert ist, desto mehr kann freigesetzt werden, wobei anzumerken ist, dass etwa 60% des dort gespeicherten Kalziums bei einer Kontraktion ins Zytosol freigesetzt werden (Fredersdorf et al. 2012).

Die Repolarisation und der damit einhergehende Rücktransport des Kalziums verlaufen zehnmal langsamer als die Depolarisation. Verantwortlich dafür ist die in der Membran des *sarkoplasmatischen Retikulums* lokalisierte Kalzium-ATPase (SERCA). Durch eine hohe zytoplasmatische Kalziumkonzentration wird Phospholamban (die inhibitorische Untereinheit der SERCA) phosphoryliert und damit inaktiviert. Die SERCA pumpt zytoplasmatische Kalzium ins *sarkoplasmatische Retikulum* zurück und es kommt zur Relaxation der Zelle. Über diesen Weg wird etwa 70 - 90% des Kalziums aus dem Zytosol eliminiert, während weite Teile des übrigen Kalziums über einen Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) an der Zellmembran aus der Zelle befördert wird (Carvalho et al. 2006). Ein geringer Anteil wird über eine zusätzliche SERCA an der Zellmembran aus der Zelle eliminiert (Pasek et al. 2014).

Der jeweilige prozentuale Anteil von SERCA und NCX an der Kalziumelimination ist speziesspezifisch unterschiedlich. So ist bei Nagetieren die SERCA zu 90% für die Elimination des zytoplasmatischen Kalziums verantwortlich, während es beim Menschen 76% sind (Bassani et al. 1994; Li et al. 1998; Piacentino et al. 2003). Auch wird die Expression und Aktivität der SERCA unter pathophysiologischen Umständen, wie zum Beispiel einer Herzinsuffizienz, herabgesetzt (Periasamy and Kalyanasundaram 2007). Bisher sind elf SERCA-Isoformen bekannt, die von drei Genen kodiert werden und durch alternatives Spleißen in ihrer Isoform beeinflusst werden (Eulert-Grehn 2013; Periasamy and Kalyanasundaram 2007).

Wie beschrieben, wird die Kontraktion der Kardiomyozyte unter anderem durch den Kalziumtransienten bestimmt. Die Ursache für eine gesteigerte kontraktile Funktion

## Einleitung

isolierter Kardiomyozyten konnte in einem veränderten Verhältnis von SERCA zu NCX identifiziert werden (Anwar et al. 2008; Maxeiner et al. 2010). SERCA ist signifikant mehr in die Membran des *sarkoplasmatischen Retikulums* eingebaut als NCX ins Sarkolemm (Maxeiner et al. 2010). Wird unter dieser Voraussetzung mehr Kalzium in das *sarkoplasmatische Retikulum* gepumpt, so kann bei der nächsten Depolarisation mehr Kalzium ins Zytoplasma entlassen werden. Die Kontraktion jeder einzelnen Kardiomyozyte ist stark vom Kalziumtransienten abhängig. Den größten Anteil an dessen Entstehung und Elimination hat die SERCA, so dass in der vorliegenden Arbeit ein genaueres Augenmerk auf deren Expression geworfen werden soll.

### 1.7 Aufgabenstellung

Die Aufgabe der vorliegenden Promotionsarbeit bestand darin, die Bedeutung wichtiger, von adulten kardialen Progenitorzellen freigesetzter Zytokine einzeln und in Kombinationen für die kontraktile Eigenschaften kultivierter Kardiomyozyten der Ratte zu untersuchen. Weiterhin sollten zytokininduzierte Veränderungen näher charakterisiert werden.

Daraus ergeben sich folgende Aufgabenstellungen:

1. Untersuchung der Wirkung von IL-6, IL-8, MCP-1, TIMP-1 und GDF-15 auf die kontraktile Funktion isolierter Kardiomyozyten von
  - a. normotensiven Ratten
  - b. hypertensiven Ratten
2. Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven für die fünf genannten Zytokine
3. Blockade der Zytokinwirkung mittels spezifischer Antikörper
4. Detektion des SERCA/NCX-Verhältnisses auf Proteinebene der isolierten Kardiomyozyten von
  - a. normotensiven Ratten
  - b. hypertensiven Ratten
5. Kombination der Zytokine in unterschiedlichen Konzentrationen und Untersuchung der Wirkung auf die kontraktile Funktion
6. Kultivierung von kardialen Progenitorzellen unter Zugabe von Zytokinen und Untersuchung der Überstände im Bezug auf deren Wirkung auf isolierte Kardiomyozyten
7. Behandlung der Progenitorzellkulturen mit siRNA gegen IL-6, um die Rolle von IL-6 auf das Wachstum der Zellen untersuchen zu können

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Agarose	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Albumin Fraktion V (BSA)	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
AP-Puffer	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Aqua bidest	Fa. B. Braun, Melsungen
Acrylamid	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
B27 Supplement®	Fa. Life Technologies GmbH, Darmstadt
Basal Iscove Medium	Fa. Biochrom, Merch Millipore, Darmstadt
Basic fibroblast growth factor, human, recombinant (bFGF)	Fa. Life Technologies GmbH, Darmstadt
Benzonase®	Fa. Merck, Darmstadt
Carnithin	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Chloroform	Fa. Merck, Darmstadt
rm CT-1 Cardiotrophin	Fa. R&D Systems, Wiesbaden
Creatin	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cytosin-β-Arabinofuranosid	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
D(+)-Glucose-Monohydrat	Fa. Merck, Darmstadt
DTT	Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt
Duo-Set ELISA development system human IL-6 DY206	Fa. R&D Systems, Wiesbaden
EDTA-Natriumsalz	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Epidermal growth factor, human, recombinant	Fa. Calbiochem; Bezug über VWR International
Ethanol	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol absolut	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fetal calf serum (FCS)	Fa. PAA Laboratories GmbH; Cölbe
Glucose	Fa. Merck, Darmstadt
Glycin	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hepes Pufferan®	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
HiPerFect®	Fa. Qiagen GmbH, Hilden
Human GDF-15/MIC-1 (GDF-15)	Fa. PeproTech, Hamburg
Human recombinant bFGF	Fa. Life Technologies GmbH, Darmstadt
Iscoves Modified Dulbeccos Medium (IMDM)	Fa. Life Technologies GmbH, Darmstadt
Isofluran®	Fa. Baxter BRD GmbH, Unterschleißheim

## Material

Isopropanol	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe
Kaliumchlorid	Fa. Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kalziumchlorid-Hydrat krist.	Fa. Merck, Darmstadt
Kardioplege Lösung nach Buckberg	Fa. Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim
KCl	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe
Kollagenase: CLS II Nr.: C2 – 22	Fa. Biochrom; Merck Millipore, Darmstadt
L-Glutamin	Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe
M 199, Hepes	Fa. Life Technologies GmbH, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe
Mercaptoethanol	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
3-Mercapto-1-Propanol	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe
Minutil®	Fa. Ecolab BRD GmbH, Monheim am Rhein
NaCl 0,9%	Fa. B. Braun, Melsungen
Natriumchlorid	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumvanadat	Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt
NBT/BCIP substrate solution	Fa. Life Technologies GmbH, Darmstadt
Nitrotetrazolium blue chloride	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS (phosphate buffered saline)	Fa. Bionline GmbH, Luckenwalde
Penicillin-Streptomycin (100 IE/ml 100 µg/ml)	Fa. Life Technologies GmbH, Darmstadt
Phosphatase	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phosphatase-Inhibitor	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau S solution	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Poly-L-lysine 0,01%	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protease-Inhibitor	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Recombinant human MCP-1/CCL2 (MCP-1)	Fa. PeproTech, Hamburg
Recombinant rat IL-6 (IL-6)	Fa. PeproTech, Hamburg
Recombinant human IL-8 (CXCL8) (IL-8)	Fa. PeproTech, Hamburg
Recombinant human TIMP-1 (TIMP-1)	Fa. PeproTech, Hamburg
Recombinant RNAsin, ribonuclease inhibitor	Fa. Promega, Mannheim
Salzsäure (HCl)	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Schwefelsäure 95 - 97% (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sodium dodecylsulfate (SDS)	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Standard	Fa. R&D Systems, Wiesbaden

## Material

Stop solution 2 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Fa. Merck, Darmstadt
Streptavidin-HRP	Fa. R&D Systems, Wiesbaden
Taurin	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TBS	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TRIS-HCl-Puffer	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Thrombin, bovine, high activity	Fa. Calbiochem, Fa. Merck, Darmstadt
Trypsin-EDTA	Fa. PAA Laboratories, Cölbe
Trypsin: Trockensubstanz 1:250	Fa. Biochrom, Merck Millipore, Darmstadt
Tween® 20	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen

## 2.2 Puffer, Lösungen und Medien

### 2.2.1 Zellverkürzung

<u>Hepes-gepuffertes Perfusionsmedium</u>	<u>pH 7,4</u>
NaCl	110,0 mmol/l
KCl	2,6 mmol/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mmol/l
MgSO <sub>4</sub>	1,2 mmol/l
Hepes	25,0 mmol/l
Glucose	11,0 mmol/l
<u>Kollagenase-Stammlösung</u>	<u>10 ml</u>
Kollagenase	35 mg
Perfusionsmedium	9987,5 µl
CaCl <sub>2</sub> -Lösung (100 mmol/l)	12,5 µl
<u>CCT - Medium</u>	<u>pH 7,4</u>
M 199, Hepes	1 Liter
Creatin	5 mmol/l
Carnitin	2 mmol/l
Taurin	5 mmol/l
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Cytosin-β-Arabinofuranosid	10 µmol/l
<u>Vorplattiermedium</u>	<u>pH 7,4</u>
CCT	1 Liter
Penicillin-Streptomycin	2 Vol-%
Fetal calf serum (FCS)	4 Vol-%
<u>Ausplattier- und Waschmedium</u>	<u>pH 7,4</u>
CCT	1 Liter

## Material

Penicillin-Streptomycin 2 Vol-%

### 2.2.2 Zellkultur

<u>EDTA-Puffer</u>	<u>1 Liter pH 7,4</u>
Aqua bidest	1 Liter
NaCl	124,9 mmol/l
KCl	2,69 mmol/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,22 mmol/l
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	19,77 mmol/l
HEPES	0,78 mmol/l
EDTA-Na <sub>2</sub>	0,50 mmol/l

<u>Trypsin-EDTA-Lösung</u>	<u>30 ml</u>
Trypsin-EDTA	30 ml
Kollagenase: CLS II	0,5%

<u>Kardioplege Lösung nach Buckberg</u>	<u>pH 7,7</u>
Kaliumchlorid	87,28 mmol/l
Natriumchlorid	40,30 mmol/l
Trometamol (THAM)	43,63 mmol/l
Citronensäure x H <sub>2</sub> O	1,13 mmol/l
Natriumcitrat x 2 H <sub>2</sub> O	6,50 mmol/l
Natriumdihydrogenphosphat x 2 H <sub>2</sub> O	1,18 mmol/l
Glucose x H <sub>2</sub> O	231,05 mmol/l

<u>Zellkulturmedium vor Trypsinierung</u>	<u>1000 ml</u>
IMDM	880 ml
FCS	100 ml
Penicillin-Streptomycin-Lösung	20 ml
L-Glutamin	2,0 mmol/l
Mercaptoethanol 1:2	0,1 mmol/l

<u>Zellkulturmedium nach Trypsinierung</u>	<u>1000 ml</u>
IMDM	585 ml
Basal Iscove Medium	292 ml
FCS	83 ml
B27®	20 ml
Penicillin-Streptomycin	20 ml
L-Glutamin	2,0 mmol/l
EGF	10 ng/ml
bFGF	20 ng/ml
Thrombin, bovine, high activity	0,1 U/ml
rm CT-1 Cardiotrophin	40,0 nmol/l

## Material

Mercaptoethanol 1:3	0,1 mmol/l
<u>Transfektionsmedium</u>	<u>1000 ml</u>
IMDM	624 ml
Basal Iscove Medium	336 ml
B27®	20 ml
Penicillin-Streptomycin	20 ml
L-Glutamin	2,0 mmol/l
EGF	10 ng/ml
bFGF	20 ng/ml
Thrombin, bovine, high activity	0,1 U/ml
rm CT-1 Cardiotrophin	40,0 nmol/l
Mercaptoethanol 1:3	0,1 mmol/l

### 2.2.3 Western Blot

<u>Proteinisolationslösung für Western Blot</u>	<u>1 ml</u>
DTT 1 mol/l	100 µl
Protease-Inhibitor	10 µl
Phosphatase-Inhibitor	5 µl
Lysispuffer	885 µl

### Trenngel 10%

Acrylamid 29:1 (40%)	5,0 ml
TRIS/HCl-Puffer 1,5 mol/l pH 8,8	5,0 ml
Aqua bidest	9,7 ml
20% SDS	100 µl
TEMED unverdünnt	20 µl
APS (100 mg/ml)	200 µl

### Sammelgel 5%

Acrylamid 29:1 (40%)	1,25 ml
TRIS/HCL-Puffer 1,0 mol/l pH 6,8	1,25 ml
Aqua bidest	6,35 ml
20% SDS	50 µl
TEMED	10 µl
APS (100 mg/ml)	100 µl

### Laufpuffer 1x

Trisbase	pH 8,3
Glycin	25 mmol/l
SDS	190 mmol/l
	0,1 %

## Material

<u>Blotpuffer</u>	pH 8,3
Trisbase	25 mmol/l
Glycin	190 mmol/l
Methanol	20 %

<u>TBS</u>	10 x pH 7,5
Trisbase	10 mmol/l
NaCl	150 mmol/l
Aqua bidest	800 ml
HCl	Zum Einstellen des pH-Wertes

### Färbung der Membranen

4-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine salt (BCIP)	7,5 mg
Nitrotetrazolium blue chloride (NBT)	15,0 mg
AP-Puffer	30 ml

TTBS = 1 x TBS + 0,1% Tween® 20

### 2.2.4 ELISA

Wash buffer WA126	0,05% Tween® 20 in PBS
Reagent diluent	1% BSA in PBS
Substrate solution	1:1 Mixtur aus Color reagent A (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) und Color reagent B (Tetramethylbenzidin)

## **2.3 Zytokine, Antikörper und siRNA**

### 2.3.1 Zytokine

Recombinant rat IL-6	Fa. PeproTech, Hamburg
Recombinant human TIMP-1	Fa. PeproTech, Hamburg
Recombinant human IL-8 (CXCL8)	Fa. PeproTech, Hamburg
Human GDF-15/MIC-1	Fa. PeproTech, Hamburg
Recombinant human MCP-1/CCL2	Fa. PeproTech, Hamburg

### 2.3.2 siRNA

FlexiTube siRNA Hs_IL6_5 Tube-ID: 2142623	Fa. Qiagen GmbH, Hilden
Target sequence: ACCTCAGATTGTTGTTGTTAA	
FlexiTube siRNA Hs_IL6_6 Tube-ID:	Fa. Qiagen GmbH, Hilden

## Material

2142624

Target sequence:

CTGCAGGACATGACAACATCAT

FlexiTube siRNA Hs\_IL6\_1 Tube-ID:

Fa. Qiagen GmbH, Hilden

2142621

Target sequence:

CTCAAATAAATGGCTACTTA

FlexiTube siRNA Hs\_IL6\_2 Tube-ID:

Fa. Qiagen GmbH, Hilden

2142622

Target sequence:

CAGAACTTATGTTGTTCTCTA

### 2.3.3 Antikörper

Rabbit anti-rat IL-6

Fa. PeproTech, Hamburg

Rabbit anti-human IL-8

Fa. PeproTech, Hamburg

Rabbit anti-human MCP-1/MCAF

Fa. PeproTech, Hamburg

Rabbit anti-human NCX (H-300): sc-32881

Fa. Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg

Goat anti-human SERCA2 (N-19): sc-8095

Fa. Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg

Rabbit anti-actin

Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Goat anti-rabbit IgG

Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Rabbit anti-goat IgG

Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### 2.3.4 ELISA

Capture antibody part 840113 ELISA

Fa. R&D Systems, Wiesbaden

Detection antibody part 840114 ELISA

Fa. R&D Systems, Wiesbaden

## **2.4 Geräte, Gebrauchsgegenstände und Software**

### 2.4.1 Allgemein

Absauger "Vacusafe Comfort"

Fa. Integra Biosciences GmbH, Fernwald

Kühlschrank

Fa. Robert Bosch, München

Gefrierschrank economic\_no\_frost

Fa. Robert Bosch, München

Vortexer

Fa. IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen

Pipetten

Fa. Eppendorf AG, Hamburg

Wasserbad

GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH

Magnetrührer

Fa. IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen

Wärmeplatte HTM 130

Fa. Heinrich Haep HLC Haep Labor Consult, Bovenden

10 ml Röhrchen (Falcon)

Fa. Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

50 ml Röhrchen (Falcon)

Fa. Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Pipetten

Fa. Eppendorf AG, Hamburg

Pipettenspitzen 1000 µl blau

Fa. Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Pipettenspitzen 100 µl gelb

Fa. Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

## Material

Pipettenspitzen 10 µl weiß	Fa. Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Handschuhe: Nobaglove-Latex	Fa. Noba Verbandmittel Danz GmbH & Co KG, Wetter
Handschuhe Nitril	Fa. Paul Hartmann AG, Heidenheim
Skalpell	Fa. Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Mikroreaktionsgefäß 1,5 ml	Fa. Sarstedt & Co., Nümbrecht
Microsoft Office®	Fa. Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
SPSS® 22.0	Fa. IBM, Armonk, NY, USA
Irfan View®	Fa. Irfan Skiljan, Wiener Neustadt, Österreich
Citavi® 4.5	Fa. Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, CH

### 2.4.2 Myozytenpräparation

Narkosekammer	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe
Perfusionsanlage	Eigenbau Physiologisches Institut JLU Gießen
Wasserbad Myozytenisolierung	Fa. Julabo GmbH, Seelbach
Tissue chopper (Gewebschneider)	Fa. Bachofer; Bezug über Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA
Zentrifuge, Megafuge 2.0 Roter Nr 8155	Fa. Heraeus Holding GmbH, Hanau
Nylonnetz, Maschenweite 200 µm	Fa. NeoLab Migge GmbH, Heidelberg
Kapselpinzette, Gill-Arruga-Kolibri-Pinzette	Fa. Eickemeyer, Tuttlingen
Bauchdeckenschere, gebogen st/st 160mm	Fa. Aesculap, Tuttlingen (B.Braun, Melsungen)
Präparierschere groß, 179 mm	Fa. Aesculap, Tuttlingen (B.Braun, Melsungen)
Präparierschere klein	Fa. Aesculap, Tuttlingen (B.Braun, Melsungen)

### 2.4.3 Myozytenisolierung

Wistar-Ratten	Fa. Janvier Labs, Le Genest St. Isle, Frankreich
Spontaneous hypertensive rat/KyoRj	Fa. Janvier Labs, Le Genest St. Isle, Frankreich
Nylonnetz, Maschenweite 200 µm	Fa. NeoLab Migge GmbH, Heidelberg
Gill-Arruga-Kolibri-Kapselpinzette	Fa. Eickemeyer, Tuttlingen Nr: 171307
Präparierscheren	Fa. Aesculap, Melsungen

### 2.4.4 Zellverkürzung

Zellkulturschale Falcon 353001	Fa. BD, Heidelberg
Brutschrank	Fa. Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge: Microfuge 18 Centrifuge	Fa. Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Zeilenkamera one dimension camera ZK4	Fa. Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Monitor	Fa. Phillips GmbH Market DACH, Hamburg
Oszilloskop: GoldStar OS-9020A 20MHz	Fa. Gold Star Co (LG Electronics), Seoul, Südkorea
Mikroskop Zellverkürzung, Nikon TMS	Fa. Nikon GmbH, Düsseldorf
Sterilbank, LaminAir HBB 2472	Fa. Heraeus Holding GmbH, Hanau
Brutschrank: Heraeus BBD 6220	Fa. Heraeus Holding GmbH, Hanau

## Material

Impulsgeber / Stimulator T  
MUCELL®

Eigenbau Physiologisches Institut JLU Gießen  
Fa. Scientific Instruments GmbH, Heidelberg

### 2.4.5 Western Blot

Taumler  
Nitrocellulosemembran  
Zellschaber  
Geldokumentationssystem: Multimage light  
cabinet  
Taumler PS-3D  
pH-Meter Lab 850  
Semidry-Blotkammer & Stromgeber  
Vakumierer: Krups Vakupak 2 Plus  
Alpha DigiDoc™ 1201  
Analysis tool software®

Fa. Biometra GmbH, Göttingen  
Fa. Life Technologies GmbH, Darmstadt  
Fa. Corning Incorporated, Corning, NY, USA  
Fa. Alpha Innotech Corporation, San Leandro,  
CA, USA  
Fa. Grant-bio, Cambridge, UK  
Fa. Schott Instruments, Mainz  
Fa. Biometra GmbH, Göttingen  
Fa. Krups GmbH, Offenbach  
Fa. Alpha-InnoTec Sun GmbH, Tholey, BRD  
Fa. Ray Biotech Inc., Nordcross, GA, USA;  
Bezug über Hölzel Diagnostika Handels GmbH,  
Köln

### 2.4.6 Zellkultur

Zellkulturschale Falcon 353003  
Sterilbank: LaminAir HBB 2472  
Tissue chopper (Gewebschneider)  
  
Mischer  
Brutschrank Zellverkürzung  
Mikroskop für Fotos Biozero  
Nikon Plan Fluor 20 x PH1 Objektiv  
BZ-Analyzer & BZ-Oberservator

Fa. BD, Heidelberg  
Fa. Heraeus Holding GmbH, Hanau  
Fa. GaLa Instrumente Handels GmbH, Bad  
Schwalbach  
Fa. IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen  
Fa. Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach  
Fa. Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg  
Fa. Nikon GmbH, Düsseldorf  
Fa. Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg

### 2.4.7 ELISA

96-Well Platten  
Multipette  
ELISA-reader infinite  
i-control™ Software

Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe  
Fa. Eppendorf AG, Hamburg  
Fa. Tecan Group Ltd., Männedorf, CH  
Fa. Tecan Group Ltd., Männedorf, CH

### 3 Methoden

#### 3.1 Zellverkürzung

Die Verkürzung isolierter Kardiomyozyten in der Primärkultur des Rattenherzens während der durch elektrische Stimulation der Zellkultur *in vitro* induzierten systolischen Kontraktionen stellen, ebenso wie das Verhältnis aus Verkürzung zu diastolischer, longitudinaler Länge der Kardiomyozyten die wichtigsten analytischen Parameter zur Erfassung einer möglichen Modulation der Herzfunktion durch verschiedene Zytokine dar.

##### 3.1.1 Gewinnung adulter ventrikulärer Kardiomyozyten aus dem Rattenherz

###### 3.1.1.1 Tiere

Zur Messung der funktionellen Zellverkürzung wurden isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten der Ratte verwendet. Als Spendertiere dienten 16 Wochen alte männliche Wistar-Hannover-Ratten mit einem Körpergewicht von 300 - 400 g. Des Weiteren wurden Kardiomyozyten von hypertensiven Ratten isoliert. Hierfür wurde die männliche, spontan hypertensive Ratte (SHR/KyoRj) der Firma Janvier Labs gewählt. Diese entwickelt im Alter von 7 - 15 Wochen einen spontanen Bluthochdruck polygenetischen Ursprungs (Janvier Labs). Sowohl die Wistar-Hannover- als auch die SHR-Ratten wurden im zentralen Tierstall der Justus-Liebig-Universität Gießen gehalten und mit Standardfutter Altromin® (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG) gefüttert, welches ihnen, wie das Trinkwasser, *ad libitum* zur Verfügung stand. Die Tiertötungsanzeige nach §4 Abs. 3 Tierschutzgesetz unter dem Aktenzeichen 510\_M und der Projektnummer 1114 erfolgte über die Tierschutzbeauftragte der JLU Gießen. Im zentralen Tierstall wurden bis zu vier Ratten in Typ IV Makrolon-Käfigen (Ehret Labor- und Pharmatechnik GmbH und Co. KG, Emmendingen) bei  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $55 \pm 10\%$  relativer Luftfeuchte und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12:12 Stunden gehalten.

###### 3.1.1.2 Kardiomyozytenpräparation

Die Präparation der ventrikulären Kardiomyozyten erfolgte nach dem Protokoll von Piper et al. (1982). Die für diese Zwecke angefertigte Perfusionsanlage (Eigenbau des Physiologischen Instituts der JLU Gießen) wurde mit Powell-Medium blasenfrei gefüllt und auf  $37^\circ\text{C}$  erwärmt. Die Tötung der Ratten wurde in Übereinstimmung mit den Richtlinien des „guide for care and use of laboratory animals“ (publication Nr. 85-23, revision 1996) des National Institutes for Health (NIH) durchgeführt und erfolgte in tiefer Isofluran-Narkose durch Genickbruch. Das Tier wurde hierzu von der technischen

## Methoden

Angestellten Frau Daniela Schreiber in die Narkosekammer (Carl Roth GmbH & Co. KG) gesetzt und mit fünf Vol-% Isofluran betäubt. Nach drei bis fünf Minuten hatte das Tier eine tiefe Narkose erreicht, welche durch die Muskeler schlaffung und die Abwesenheit des Kornealreflexes geprüft wurde. In diesem Stadium nahm Frau Schreiber das Tier aus der Kammer und legte es flach auf den Bauch. Mit einer Schere in der rechten Hand, welche am Hinterkopf angelegt wurde, und dem Becken mit den Hintergliedmaßen des Tieres in der linken Hand führte sie eine schnelle ruckartige Bewegung in entgegengesetzte Richtung aus und brach dem Tier so das Genick, was durch sofortiges Einstellen der Atmung und totale Muskeler schlaffung deutlich erkennbar war. Es folgte die Eröffnung des Thorax auf Höhe des Zwerchfells und die Entnahme von Lunge, Herz und Thymus *in toto*, wobei das Herz aufgrund seiner Reizbildungsautonomie noch schlug. Zusammen wurden diese Organe in 4°C kalte, 0,9% NaCl-Lösung überführt und das Herz von Mediastinum, Ösophagus, Thymus, Trachea, Lunge und Perikard befreit. Hierbei stellte das Herz seine Kontraktionen ein. Das nadelförmige, stumpfe Durchflussventil am unteren Ende der nun erwärmten Perfusionsanlage wurde geöffnet, so dass das Medium tropfenweise austreten konnte. Hieran wurde das Herz durch Einstülpen in die Aorta angehängt, mit einem Bindfaden befestigt und retrograd perfundiert. War das Herz blutfrei, so wurde dem Medium die Kollagenase zugefügt. Es erfolgte eine 30-minütige enzymatische Aufschlüsselung, bei der das Medium durch das Herz strömte und die Kollagenfasern auflöste. Das Eluat wurde dann mittels einer Schlauchpumpe rezirkuliert.

Im Verlauf des enzymatischen Aufschlusses wurde das Herz zusehends farblos und schlaff. Anschließend wurde das weiche Herzgewebe abgehängt und die verbliebenen größeren Gewebestücke mittels eines Gewebsschneiders (Einstellung: 7 µm) zerkleinert. Es folgte ein fünfminütiger Nachverdau in Kollagenase-haltigem Perfusionsmedium, nach welchem die groben Gewebestücke durch eine Nylongaze (200 µm Porengröße) herausgefiltert wurden. Der sich daran anschließende Zentrifugationsschritt dauerte drei Minuten bei 400 rpm („rounds per min“); das daraus entstandene Zellpellet wurde in sechs ml Powell-Medium und 12,5 µl Kalziumchlorid (100 mmol/l) resuspergiert und erneut für drei Minuten bei 400 rpm zentrifugiert. Die sich anschließende Resuspergierung erfolgte erneut in 6 ml Powell-Medium und 25 µl Kalziumchlorid (100 mmol/l). Nach einer weiteren Zentrifugation bei 400 rpm erfolgte die Resuspergierung des Zellpellets in 60 µl Kalziumchlorid (100 mmol/l). Zum Abschluss wurden die Zellen bei 300 rpm für eine Minute zentrifugiert. Bei diesen Schritten kam es zur Trennung der vereinzelter Kardiomyozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und glatter Muskelzellen voneinander und zur „Gewöhnung“ der Kardiomyozyten

## Methoden

an den physiologischen Kalziumgehalt des CCT-Mediums. Das Kardiomyozytenpellet wurde in 24 ml CCT-Medium resuspergiert. Vom lebenden Tier bis zu diesem Schritt erfolgte die Kardiomyozytenpräparation stets durch Frau Daniela Schreiber in meinem Beisein. Alle weiteren Schritte habe ich eigenhändig durchgeführt.

### 3.1.2 Kultivierung und Inkubation der isolierten Kardiomyozyten

Aus den mindestens eine Stunde zuvor mit Vorplattiermedium vorbereiteten Zellkulturschalen aus Polystyrol (BD, Falcon 353001) wurde das Medium abgesaugt und diese nachfolgend mit jeweils 1,0 ml Kardiomyozyten-CCT-Medium gefüllt. Die Aufnahme des Kardiomyozytenpellets aus einer Gewebspräparation in 24 ml Medium und das anschließende Ausplattieren von 1,0 ml je Zellkulturschale führten zur optimalen Kardiomyozytendichte für die Zellkontraktionsmessung (s. Kap. 3.1.3). Bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und unter CO<sub>2</sub>-freier Atmosphäre (Helgason and Miller 2005) ruhten die Kardiomyozyten für zwei Stunden im Brutschrank und adherierten am Boden der Zellkulturschale. Es folgten zwei Medienwechsel mit warmem CCT-Medium, um nicht anhaftende Zellen zu entfernen. Abschließend wurde jede Zellkulturschale erneut mit 1,0 ml CCT-Medium versehen. In diesem Medium wurden auch die anschließenden Versuche durchgeführt.

#### 3.1.2.1 Inkubation mit einzelnen Zytokinen

Nach abgeschlossenem Medienwechsel erfolgte die Inkubation der Kardiomyozyten mit Zytokinen. Jede der 24 Zellkulturschalen einer Präparation wurde jeweils mit nur einem Zytokin in einer Konzentrationsstufe (g/ml; dekadisch logarithmische Skalierung) inkubiert (Tab. 2). Zuvor angelegte Verdünnungsreihen (1:10) der fünf Zytokine (IL-6, IL-8, GDF-15, MCP-1, TIMP-1) gewährleisteten eine Zugabe von jeweils 10 µl Zytokin-Lösung (Verdünnungsfaktor 1:100) zu einer Kardiomyozyten-Zellkulturschale. Im Allgemeinen galt, dass Kardiomyozyten ohne Zusatz von Zytokinen als Kontrolle genutzt wurden (nativ). Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit in CO<sub>2</sub>-freier Atmosphäre mit dem jeweiligen Zytokin inkubiert und am nächsten Tag stimuliert und vermessen.

**Tabelle 2: Eingesetzte Zytokine und deren Endkonzentrationen in Primärkulturen von Kardiomyozyten des Rattenherzens**

Das jeweilige Zytokin [Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 8 (IL-8), growth differentiation factor-15 (GDF-15), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1)] wurde in einem Volumen von 10 µl pro Zellkulturschale (Vol.: 1,0 ml CCT-Medium) appliziert (angegeben sind die Endkonzentrationen). Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte die quantitative Bestimmung der Zellverkürzung im elektrischen Feld.

Zytokin	Konzentration	Zytokin	Konzentration	Zytokin	Konzentration
IL-6	100 pg/ml	IL-8	100 pg/ml	GDF-15	100 pg/ml
	1 ng/ml		1 ng/ml		1 ng/ml
	10 ng/ml		10 ng/ml		10 ng/ml
	100 ng/ml		100 ng/ml		100 ng/ml
	1 µg/ml		1 µg/ml		1 µg/ml
MCP-1	100 pg/ml	TIMP-1	100 pg/ml		
	1 ng/ml		1 ng/ml		
	10 ng/ml		10 ng/ml		
	100 ng/ml		100 ng/ml		
	1 µg/ml		1 µg/ml		

### 3.1.2.2 Inkubation mit Kombinationen aus Zytokinen

Um mögliche synergistische oder antagonistische Effekte von Zytokinen zu untersuchen, wurden die in dieser Arbeit bereits einzeln getesteten Zytokine in Zweierkombinationen den Kardiomyozytenkulturen appliziert und diese in Bezug auf ihre kontraktile Funktion untersucht. Die Inkubation erfolgte wie in Kap. 3.1.2.1 beschrieben. Dabei wurden zunächst diejenigen Zytokinkonzentrationen eingesetzt, welche in den Einzelmessungen in geringster Konzentration zu signifikanten Effekten geführt haben (Tab. 3; „hohe Konzentration“), wobei bei GDF-15 wegen ausbleibender signifikanter Effekte die Konzentration 1 ng/ml gewählt wurde. In einer weiteren Versuchsreihe wurden beide Zytokine in einer Verdünnungsstufe niedriger eingesetzt (Tab 3; „niedrige Konzentration“), um herauszufinden, ob auch diese noch in der Lage war, einen signifikanten Effekt auf die kontraktile Funktion isolierter Kardiomyozyten auszulösen. Die Inkubation der Kardiomyozyten mit den jeweiligen Zytokinkombinationen erfolgte verblindet durch die medizinisch-technische Angestellte Gudrun Pfeiffer. Auch hier galten native Zellen als Kontrolle. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37°C, 95%

## Methoden

Luftfeuchtigkeit in CO<sub>2</sub>-freier Atmosphäre inkubiert und am nächsten Tag im elektrischen Feld stimuliert und vermessen (s. Kap. 3.1.3).

**Tabelle 3: Zytokinkombinationen in den jeweiligen Verdünnungsstufen, mit denen die isolierten Kardiomyozyten inkubiert wurden**

Kombinationen aus jeweils zwei (einzeln appliziert stimulatorischen) Zytokinen in jeweils einer „hohen“ sowie einer zehnfach „niedrigeren“ Konzentration. Kultivierte Kardiomyozyten der Ratte wurden entsprechend über 24 Stunden inkubiert, um anschließend im elektrischen Feld im Bezug auf ihre kontraktile Funktion untersucht werden zu können. Der Übersicht halber werden die jeweiligen Kombinationen zweier Zytokine als „hohe Konzentration“ und „niedrige Konzentration“ bezeichnet.

Zytokinkombination	Konzentrationen	Kombination
IL-6 + IL-8	10 ng/ml + 1 ng/ml	hohe Konzentration
	1 ng/ml + 100 pg/ml	niedrige Konzentration
IL-6 + TIMP-1	10 ng/ml + 1 ng/ml	hohe Konzentration
	1 ng/ml + 100 pg/ml	niedrige Konzentration
TIMP-1 + IL-8	1 ng/ml + 1 ng/ml	hohe Konzentration
	100 pg/ml + 100 pg/ml	niedrige Konzentration
IL-6 + GDF-15	10 ng/ml + 1 ng/ml	hohe Konzentration
	1 ng/ml + 100 pg/ml	niedrige Konzentration
IL-6 + MCP-1	10 ng/ml + 100 ng/ml	hohe Konzentration
	1 ng/ml + 10 ng/ml	niedrige Konzentration
IL-8 + GDF-15	1 ng/ml + 1 ng/ml	hohe Konzentration
	100 pg/ml + 100 pg/ml	niedrige Konzentration
IL-8 + MCP-1	1 ng/ml + 100 ng/ml	hohe Konzentration
	100 pg/ml + 10 ng/ml	niedrige Konzentration
TIMP-1 + GDF-15	1 ng/ml + 1 ng/ml	hohe Konzentration
	100 pg/ml + 100 pg/ml	niedrige Konzentration
TIMP-1 + MCP-1	1 ng/ml + 100 ng/ml	hohe Konzentration
	100 pg/ml + 10 ng/ml	niedrige Konzentration
MCP-1 + GDF-15	100 ng/ml + 1 ng/ml	hohe Konzentration
	10 ng/ml + 100 pg/ml	niedrige Konzentration

### 3.1.2.3 Präadsorption von Zytokinen mit spezifischen Antikörpern

Ziel dieser Versuchsreihe war es herauszufinden, welches der jeweils zwei Zytokine in der Kombinationsapplikationsstudie an den Effekten in welchem Ausmaß beteiligt war

## Methoden

und ob es gegebenenfalls durch die Kombination zweier Zytokine zu einer additiven Wirkung kam. Dazu wurden spezifische Antikörper eingesetzt, welche das jeweilige Zytokin binden und damit zumindest partiell neutralisieren sollten, um deren Wirkung zu hemmen bzw. zu unterbinden. Es wurden hierzu exemplarisch Antikörper spezifisch für IL-6, IL-8 und MCP-1 eingesetzt.

Das jeweilige Zytokin betreffend wurde die geringste Konzentration, bei der ein signifikanter Effekt erzielt wurde aus den in Kap. 3.1.2.1 beschriebenen Versuchen gewählt; bei GDF-15 wurde wegen ausbleibender signifikanter Effekte 1 ng/ml gewählt. Im Rahmen der Applikation von Zytokinkombinationen wurden ebenfalls die „hohen Zytokinkonzentrationen“ eingesetzt. Zur Neutralisation des jeweiligen Zytokins (IL-6, IL-8 oder MCP-1) erfolgte eine Inkubation des entsprechenden Antikörpers mit dem Zytokin (den Zytokinen) in dessen (deren) Endkonzentration in 1,0 ml CCT-Medium für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Dabei wurde der jeweilige Antikörper in einer 1:400 Verdünnung zugesetzt; dies entsprach Konzentrationen von 1,5 µg/ml für den IL-6 bzw. MCP-1 spezifischen Antikörper, sowie 3,0 µg/ml für den IL-8 Antikörper, gemäß Empfehlungen des Herstellers zur Absättigung mit dem entsprechenden Antigen. Primärkulturen der Kardiomyozyten wurden dann mit den in CCT-Medium angesetzten Zytokin-Antikörper Komplexen für 24 Stunden bei 37°C und 95% Luftfeuchte in CO<sub>2</sub>-freier Atmosphäre inkubiert. Um die Vergleichbarkeit mit den Einzelzytokinmessungen gewährleisten zu können, wurden parallel nochmals Zellinkubationen mit jeweils einem der Zytokine durchgeführt. Die Kombinationen sind Tab. 4 zu entnehmen.

**Tabelle 4: Inkubation primärer Kardiomyozyten mit freien bzw. an spezifische Antikörper gebundenen Zytokinen: eingesetzte Kombinationen und Konzentrationen**

Einsatz von Zytokinen bzw. Zytokinkombinationen zur Modulation der kontraktile Kapazität einzelner Kardiomyozyten in der Primärkultur in freier Form bzw. adsorbiert an spezifische Antikörper (für IL-6, IL-8 und MCP-1). Die Zytokine wurden in denjenigen Konzentrationen verwendet, die in den Einzel- und Kombinationsmessungen (Kap. 3.1.2.1 und 3.1.2.2) in der geringsten Konzentration signifikante Effekte erzielten (mit Ausnahme von GDF-15). Kardiomyozyten der Ratte wurden dabei inkubiert mit (a) einzelnen Zytokinen, (b) spezifischen Antikörpern (AKs) gegen IL-6, IL-8 oder MCP-1, (c) Antikörpergebundenen Zytokinen (d) Zytokinkombinationen mit IL-6, (e) Zytokinkombinationen mit IL-6 spezifischen AKs sowie (f) Zytokinkombinationen mit IL-8 bzw. MCP-1 spezifischen AKs.

	Zytokin(e) / Antikörper	Konzentrationen
(a) Einzelne Zytokine	IL-6	10 ng/ml

## Methoden

	IL-8		1 ng/ml
	MCP-1		100 ng/ml
	GDF-15		1 ng/ml
	TIMP-1		1 ng/ml
<b>(b) Antikörper</b>	Anti IL-6 Antikörper (AK)		1,5 µg/ml
	Anti IL-8 Antikörper		3,0 µg/ml
	Anti MCP-1 Antikörper		1,5 µg/ml
<b>(c) Zytokin und entsprechender Antikörper</b>	IL-6 + anti IL-6 AK	10 ng/ml	+ 1,5 µg/ml
	IL-8 + anti IL-8 AK	1 ng/ml	+ 3,0 µg/ml
	MCP-1 + anti MCP-1 AK	100 ng/ml	+ 1,5 µg/ml
<b>(d) Zytokin-Kombinationen mit IL-6</b>	IL-6 + IL-8	10 ng/ml	+ 1 ng/ml
	IL-6 + MCP-1	10 ng/ml	+ 100 ng/ml
	IL-6 + GDF-15	10 ng/ml	+ 1 ng/ml
	IL-6 + TIMP-1	10 ng/ml	+ 1 ng/ml
<b>(e) Zytokin-Kombinationen mit IL-6 und IL-6 AK</b>	IL-6 + IL-8 + IL-6 AK	10 ng/ml + 1 ng/ml + 1,5 µg/ml	
	IL-6 + MCP-1 + IL-6 AK	10 ng/ml + 100 ng/ml + 1,5 µg/ml	
	IL-6 + GDF-15 + IL-6 AK	10 ng/ml + 1 ng/ml + 1,5 µg/ml	
	IL-6 + TIMP-1 + IL-6 AK	10 ng/ml + 1 ng/ml + 1,5 µg/ml	
<b>(f) Zytokin-Kombinationen mit IL-6 und anderen AKs</b>	IL-6 + IL-8 + IL-8 AK	10 ng/ml + 1 ng/ml + 3,0 µg/ml	
	IL-6 + MCP-1 + MCP-1 AK	10 ng/ml + 100 ng/ml + 1,5 µg/ml	

### 3.1.2.4 Inkubation mit Überständen

Eine weitere Inkubation der isolierten Kardiomyozyten erfolgte mit den konditionierten Überständen der in Kap. 3.2 beschriebenen Zellkultur. Dazu wurden die isolierten Überstände 1:100 mit steril filtriertem *Aqua bidest* verdünnt und entsprechende Zellkulturschalen (Vol. 1 ml) der Kardiomyozyten mit 10 µl des jeweiligen Überstandes für 24 Stunden bei 37°C und 95% Luftfeuchte in CO<sub>2</sub>-freier Atmosphäre inkubiert, so dass insgesamt eine Verdünnung des konditionierten Zellkulturüberstands von 1:10000 (Müller 2010) vorlag.

### 3.1.3 Zellverkürzungsmessung

#### 3.1.3.1 Messapparatur

Die Messung der kontraktiven Funktion rattenspezifischer Kardiomyozyten erfolgte bei Raumtemperatur und wurde mit einer Geräteanordnung der Firma Scientific Heidelberg erfasst. Hierbei handelte es sich um ein aufrechtes Mikroskop (TMS, Nikon GmbH), einen Zellstimulator (Impulsgeber, Eigenbau des Physiologischen Institutes der JLU Gießen), ein Oszilloskop (GoldStar OS-9020A 20MHz; Gold Star Co), eine Zeilenkamera (One dimension camera ZK4; Scientific Instruments GmbH) und einen Monitor (Phillips GmbH) (Abb. 2).

Die Zellkulturschale mit den am Boden anhaftenden und mit 1,0 ml CCT-Medium bedeckten Kardiomyozyten wurde mit einem Deckel abgedeckt, durch welchen zwei Platindrähte verliefen, und auf dem Mikroskoptisch positioniert. Die Platinelektroden waren parallel zueinander angelegt und tauchten senkrecht im Abstand von zwei Zentimetern ins Medium ein, um dort horizontal zu verlaufen; es handelte sich um Anode und Kathode eines Elektrostimulators. Dieser erzeugte zwischen den Platindrähten ein elektrisches Feld, in welches ein biphasischer Reiz von 0,5, 1 oder 2 Hz bei 20 V Spannung über fünf Millisekunden (ms) geleitet wurde. In der Zellkulturschale anhaftende intakte Kardiomyozyten kontrahierten gleichmäßig in der eingestellten Frequenz (30 / 60 / 120 Kontraktionen pro Minute). Es wurde eine intakte, homogen kontrahierende Kardiomyozyte ausgewählt und bei 400-facher Vergrößerung im mikroskopischen Blickfeld des aufrechten Mikroskops zentriert.

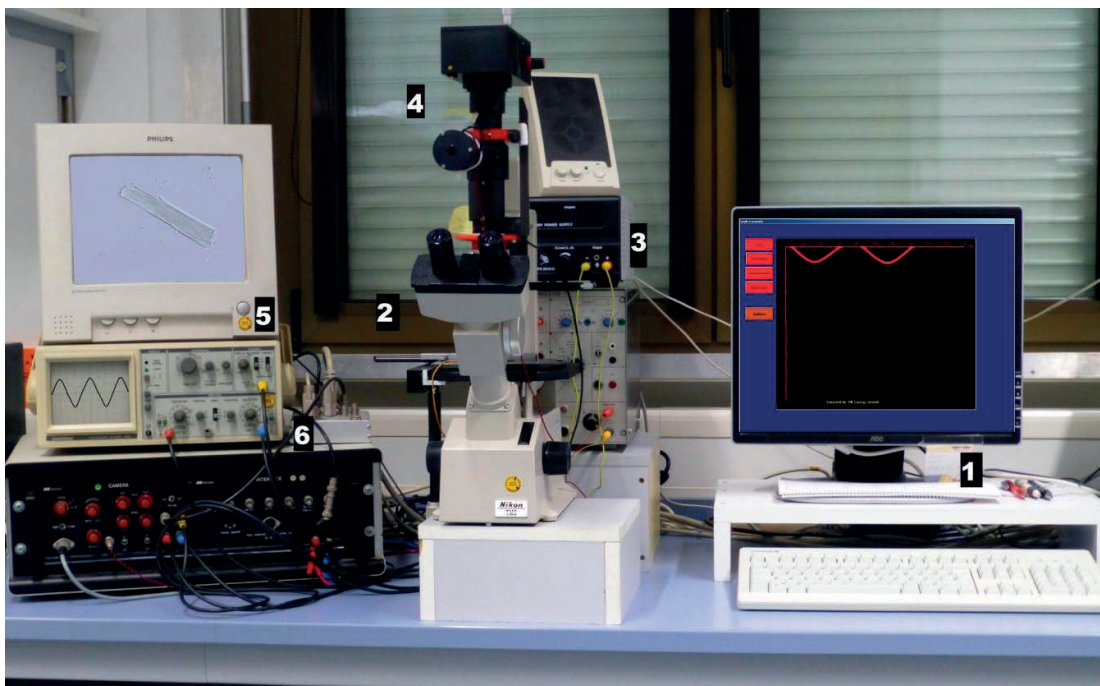
Eine auf dem Mikroskop angebrachte Zeilenkamera wurde so ausgerichtet, dass sie die Zelle in voller Länge erfasste. Diese Kamera differenzierte zwischen hell und dunkel (Zelle und Hintergrund) und erfasste dadurch die Zellgrenzen. Sie übersetzte des Weiteren optische in elektrische Signale, welche von einem angeschlossenen Oszilloskop abgegriffen und in einem Koordinatensystem dargestellt wurden. Die so während der Kontraktion sichtbar gemachten Zellgrenzen wurden mittels Zwei-Kanal-Spannung markiert und vom Programm MUCEL® der Firma Scientific in einer Sinuskurve ( $\mu\text{m}/\text{ms}$ ) dargestellt. Die angegebene Software errechnete daraus die Kontraktionsparameter der vermessenen Zelle (Tab. 5).

#### 3.1.3.2 Auswertung und statistische Analyse der Kontraktionsmessungen

Aus dem Myokard einer Ratte wurden für jedes zu testende Zytokin bzw. jede zu testende Zytokinkombination in jeweils einer Konzentration bzw. Kombination aus zwei Konzentrationen vier Zellkulturschälchen mit primären Kardiomyozyten angelegt. In

## Methoden

jeder Zellkulturschale wurden mehrere Zellen bei jeweils drei Stimulationsfrequenzen (0,5, 1 und 2 Hz) vermessen. In erster Linie wurden die Daten bei 0,5 Hz ausgewertet; bei dieser Frequenz wurde jede Kardiomyozyte viermal ( $n = 4$ ) aufeinanderfolgend vermessen und daraus ein Mittelwert gebildet. Dabei wurde als wichtigster Messparameter die Differenz aus diastolischer und systolischer Zelllänge in Prozent der maximalen diastolischen Zelllänge ( $\Delta L/L\%$ ) berechnet; eine Auswertung weiterer Parameter (Tab. 5) erfolgte nicht. Um Messungen an Kardiomyozyten einer Zellpräparation in Gegenwart z.B. unterschiedlicher Zytokinkonzentrationen miteinander vergleichen zu können, wurde bei der Bestimmung von  $\Delta L/L\%$  jeder Messwert in Anwesenheit eines/zweier Zytokine auf den Mittelwert der Kontrollen in Abwesenheit des Zytokins bezogen. Dabei lagen je nach Zytokinkonzentration  $(40 - 234) \times 4$  Datensätze von drei bis neun Ratten zugrunde. Die Ergebnisse werden als prozentuale Abweichung von der Kontrolle inkl. dem jeweiligen Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.



**Abbildung 2:   Apparatur zur Messung der kontraktiven Funktion isolierter Kardiomyozyten des Rattenherzens in Primärkultur**

Die Zellkulturschale mit den isolierten Kardiomyozyten wurde auf dem Objekttisch des Mikroskops (2) positioniert und durch einen Deckel mit Platinelektroden abgedeckt. Der Zellstimulator (3) gab über die Elektroden einen biphasischen Reiz in das Medium, woraufhin sich die Kardiomyozyten kontrahierten. Die Zeilenkamera (4) griff dieses Bild ab und übertrug es an einen Monitor (5), wo die Zellgrenzen der Kardiomyozyte erfasst wurden. Die Zeilenkamera übersetzte diese optischen Signale in elektrische, welche von dem Oszillographen (6) in einem Koordinatensystem dargestellt wurden. Durch Markierung der Zellgrenzen konnte das Programm MUCEL® am Computer (1) die Parameter der kontraktiven Funktion errechnen und darstellen.

## Methoden

Mit Hilfe des Statistik-Programms SPSS sowie Microsoft Excel wurden alle Datensätze zunächst auf Normalverteilung gemäß Shapiro Wilks getestet, hinsichtlich einer Dosis-Wirkungsbeziehung einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen und anschließend mittels Bonferoni post-hoc-Test miteinander verglichen. Unterschiede zwischen den Mittelwerten der  $\Delta L/L$ -% Werte bei einzelnen Teilstudien wurden auf folgende Signifikanzniveaus getestet:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++) oder  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++). Dabei diente das (\*) Zeichen immer dem Vergleich mit den jeweiligen Kontrollwerten, die (#) resp. (+) Zeichen dem Vergleich zwischen verschiedenen Konzentrationsstufen des/r eingesetzten Zytokins/e.

**Tabelle 5: Messparameter bei den an Kardiomyozyten der Ratte in Primärkultur durchgeführten Zellverkürzungsmessungen**

Einzelne Kardiomyozyten des Rattenherzens wurden bei Raumtemperatur repetitiv (n=4) im elektrischen Feld stimuliert (0,5 Hz, 20 V, 5 ms) und die jeweils ausgelöste Kontraktion analysiert. Für die jeweils erhobenen Parameter wurde der Mittelwert gebildet. Dabei erwies sich - wie in anderen Arbeiten (Anwar et al. 2008, Engel 2008, Maxeiner et al. 2010, Müller 2010) - die Differenz zwischen diastolischer und systolischer Zelllänge ( $\Delta L$ ) in Prozent der maximal diastolischen Zelllänge (L) als entscheidender Parameter ( $\Delta L/L$ ) für die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten.

<u>Abkürzung</u>	<u>Erklärung</u>
L Diast = L	Mittelwert der maximalen diastolischen Zelllänge ( $\mu\text{m}$ )
Amplitude	Mittelwert der minimalen systolischen Zelllänge ( $\mu\text{m}$ )
TTP	Time-to-peak: Mittelwert der Zeit von Beginn bis zur max. Kontraktion (ms)
TTP50%	Mittelwert der Zeit von der Hälfte (50%) der Kontraktion bis zu max. Kontraktion (ms)
R50%	Mittelwert der Zeit, in der die Zelle zwischen max. Kontraktion und max. Relaxation die Hälfte der Länge erreicht hat (ms)
R50-TTP50	Mittelwert der Zeit, in der die Zelle 50% der Kontraktion bis zur max. Kontraktion erreicht hat (ms)
$\Delta L/L$ -%	Differenz zwischen diastolischer zu systolischer Zelllänge [ $\Delta L$ ] in Prozent (%) der maximalen diastolischen Zelllänge [L]
Contraction V	Mittelwert der max. Kontraktionsgeschwindigkeit ( $\mu\text{m/s}$ )
Relaxation V	Mittelwert der max. Relaxationsgeschwindigkeit ( $\mu\text{m/s}$ )
Mean shortening	durchschnittliche Verkürzungsamplitude ( $\mu\text{m/s}$ )

### 3.1.4 Isolierung der Kardiomyozyten für die Western Blot Analyse

Nach Beendigung der Zellkontraktionsmessungen wurden die Zellen für den semi-quantitativen Nachweis bestimmter Proteine im Western Blot (s. Kap. 3.3) isoliert. Hierzu wurden je Kardiomyozytenkulturschale 100 µl der „Proteinisolutionslösung“ eingesetzt (s. Kap. 2.2.3). Das CCT-Kultur-Medium jeder Kardiomyozytenkulturschale wurde verworfen und diese mit je 1,0 ml PBS gespült und anschließend mit 100 µl der „Proteinisolutionslösung“ gefüllt. Zur gründlichen Verteilung der Lösung wurden die Zellkulturschalen dann für 15 Minuten auf einen Taumler (Biometra GmbH) bei 200 rpm und Raumtemperatur positioniert. DTT verhinderte dabei die Aggregation von Proteinen und hemmte die Oxidation von Schwefelwasserstoffbrücken zu Disulfidbrücken, während Protease- und Phosphatase-Inhibitoren (s. Kap. 2.2.3) lösliche Enzyme daran hinderten, die entsprechenden Proteine abzubauen. Zum Abbau später störender Nukleinsäuren wurden nach 15 Minuten jeder Zellkulturschale fünf µl Benzonase® (1:30 verdünnt) zugegeben. Nach weiteren zehn Minuten auf dem Schüttler wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Oberfläche der Zellkulturschale gelöst und in ein entsprechendes Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Aufbewahrung bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei -22°C.

## **3.2 Kultivierung von Progenitorzellen aus Herzgewebe**

Neben der Wirkung pro- und anti-inflammatorischer Zytokine auf die kontraktile Funktion kultivierter isolierter Kardiomyozyten des Rattenherzens sollte im folgenden Versuchsansatz die Kultivierung kardialer Progenitorzellen (CPCs) etabliert und die parakrine Freisetzung der von ihnen produzierten Zytokine analysiert werden. Die Grundlage für die Versuche stellten zum einen Herzgewebeproben aus der Humanmedizin, zum anderen Herzgewebeproben von Ratten dar. Die dem Herz angehörigen Zellen (Kardiomyozyten, Progenitorzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen) wurden zunächst vereinzelt und bildeten während der mehrwöchigen Kultivierungsphase einem konfluenten Zellrasen aus.

### 3.2.1 Gewinnung myokardialer Progenitorzellen

#### 3.2.1.1 Humane Gewebeproben

Um die mögliche parakrine Zytokinfreisetzung kardialer CPCs untersuchen zu können, mussten diese zunächst isoliert und kultiviert werden. In vorherigen Studien konnten Maxeiner et al. (2010, 2014) zeigen, dass kardiale Progenitorzellkulturen bestimmte Zytokine stärker ins Medium sezernierten als andere, nicht-kardiale Zellkultu-

## Methoden

ren. Um die von CPCs in den Zellkulturüberstand abgegebenen Zytokine nachzuweisen und ihre Wirkung auf isolierte Kardiomyozyten der Ratte untersuchen zu können, wurden kardiale Progenitorzellkulturen angelegt. Das dafür benötigte Gewebe entstammte atrialem und ventrikulärem Gewebe von Patienten der Abteilung für Herzchirurgie des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Hierfür lag ein positives Votum der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der JLU Gießen vor (Az 123/06). Die Patienten bzw. Sorgeberechtigten wurden über die Verwendung des Gewebes aufgeklärt und willigten hierzu schriftlich ein. Die jeweilige Gewebeprobe wurde nach Entnahme *intra operationem* in eine kardioplege Lösung nach Buckberg überführt (s. Kap. 2.2.2) und bei 4°C gekühlt. Die weiteren Schritte zur Etablierung der CPC-Zellkultur erfolgten nach dem Protokoll der Arbeitsgruppe Messina et al. (2004) und werden im Kap. 3.2.3 beschrieben.

### 3.2.1.2 Ratten-Gewebeproben

Zur Gewinnung des Herzgewebes von Ratten wurden männliche Wistar-Ratten (Janvier Labs, Le Genest St. Isle, Frankreich) im Alter von 16 Wochen und 300 - 400 g Körpergewicht gewählt, sowie männliche spontan hypertensive KyoRj-Ratten (kurz: SHR; Janvier Labs) ebenfalls im Alter von 16 Wochen mit 300 - 400 g Körpergewicht. Sie wurden - wie in Kap. 3.1.1.2 beschrieben - in tiefer Anästhesie mittels zervikaler Dislokation getötet. Anschließend wurde der Thorax eröffnet, das Herz entnommen und in kardioplege Lösung überführt.

### 3.2.2 Anlegen primärer Zellkulturen aus kardialem Gewebe

Die humanen Gewebeproben wurden aus der kardioplegen Lösung schnellstmöglich entnommen und mittels Gewebsschneiders in ca. 1 mm große Stücke zerkleinert. Die Rattenherzen wurden zunächst mit einem sterilen Skalpell grob zerkleinert und im Anschluss analog zu den humanen Gewebeproben weiterverarbeitet. Die so präparierten kardialen Gewebestücke (Mensch, Ratte) wurden in eine 30 ml Medium fassende Zellkulturschale (BD, Falcon 353003) transferiert und je dreimal mit 10 ml PBS gewaschen. Nach letztmaligem Absaugen der PBS-Lösung wurden die Gewebestückchen dreimal für fünf Minuten mit einer Trypsin-EDTA-0,5%-Kollagenase-Lösung (s. Kap. 2.2.2) enzymatisch aufgeschlossen. Während der Inkubation war auf ein vorsichtiges aber stetes Schwenken der Zellkulturschale zu achten; beim letzten Absaugen wurde die gesamte überdeckende Flüssigkeit abgesaugt. Mit 10 ml „Nährmedium vor

## Methoden

Trypsinierung“ (s. Kap. 2.2.2) wurden die Zellen letztmals gewaschen und danach mit 30 ml frischem „Nährmedium vor Trypsinierung“ versetzt. Die Zellen wurden zunächst bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> für eine Woche inkubiert. Die Primärkulturen wurden mit der Bezeichnung „H“ für human, sowie „W“ für normotensive (Wistar) und „SHR“ für spontan hypertensive (SHR) Ratten und einer fortlaufenden Nummer markiert.

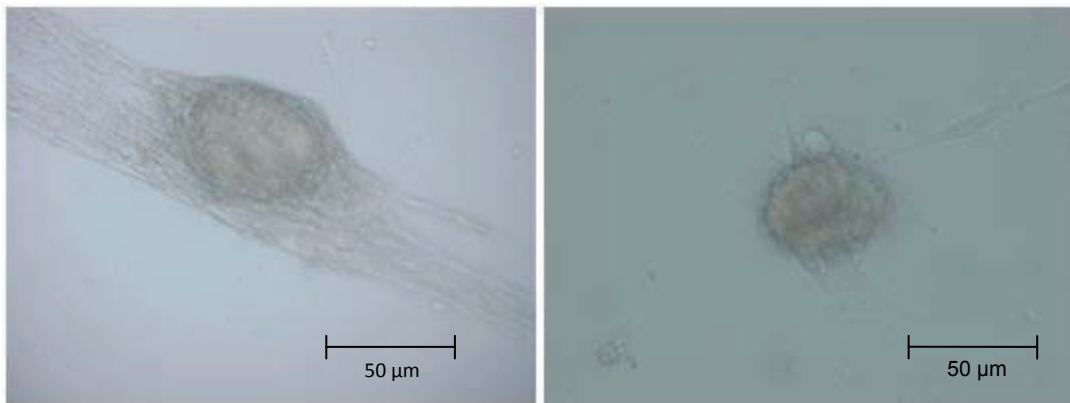
### 3.2.3 Etablierung der Progenitorzellkulturen

Nach einwöchiger Kultivierung im Inkubator inklusive Adhäsion der Zellen am Boden der Zellkulturschalen wurde mit dem Wechsel des Mediums begonnen. Hierzu wurden die kardialen Zellkulturen unter mikroskopischer Kontrolle hinsichtlich Differenzierung und Konfluenz beurteilt, und nicht anhaftende Gewebestücke entfernt. Anschließend wurde die Hälfte des Mediums (15 ml) entnommen und durch frisches, auf 37°C angewärmtes „Medium vor Trypsinierung“, ersetzt. Dieser Vorgang wurde alle zwei Tage wiederholt, bis die Zellen einen konfluenten „Zellrasen“ gebildet hatten. Dieser entsteht durch das sequentielle Auswachsen von Fibroblasten und Endothelzellen (Scheufen 2012).

Nach vier Wochen in der Primärkultur hatten die human- bzw. rattenspezifischen kardialen Zellen einen konfluenten Zellrasen gebildet, der vor allem aus Fibroblasten bestand, auf welchem kleine, hell leuchtende Zellen sichtbar wurden, die als „phase-bright cells“ (PBCs) bezeichnet werden. Durch vorsichtiges Abheben konnten die PBCs isoliert und in mit Poly-L-Lysin beschichtete Zellkulturschalen mit speziellem Medium weiter kultiviert werden. Im Rahmen dieses Vorganges wurde zunächst das Kulturmedium („Überstand vor Trypsinieren“) abpipettiert und bei -20°C konserviert. Die kardialen Zellkulturen inklusive der PBCs wurden zuerst mit PBS und dann mit EDTA-Puffer gewaschen, um anschließend mit Trypsin-EDTA versetzt zu werden. Durch die Behandlung mit Trypsin lösten sich als erstes die hell leuchtenden PBCs, dann die Fibroblasten und mit ihnen die anderen Zellen. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden deshalb die PBCs isoliert und in frisch angesetztes „Medium nach Trypsinieren“ (s. Kap. 2.2.2) - auch als „cardiosphere outgrowing medium“ bezeichnet - überführt, welches neben den Nährstoffen diverse Wachstumsfaktoren enthielt. Die so gewonnene Zellsuspension wurde in zuvor mit 500 µl Poly-L-Lysin (0,01%) beschichtete Zellkulturschalen ausgebracht, mit nachfolgender 14-tägiger Anzuchtphase. In dieser Zeit wurde den Zellen jeden zweiten Tag die Hälfte des Mediums entzogen und durch frisches „Medium nach Trypsinierung“ entsprechender Menge ersetzt. Metho-

## Methoden

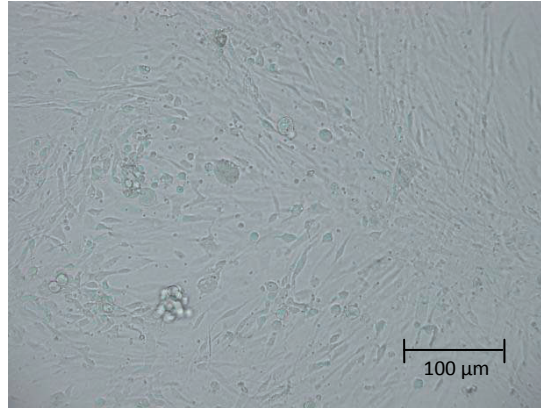
disch bedingt gelang es nicht vollständig, beim Trypsinieren selektiv nur die PBCs zu gewinnen, so dass auch andere Zelltypen (z.B. Fibroblasten) als Kontaminante mit in die neuen Zellkulturschalen überführt wurden. In Folge dessen kam es wiederum zur Ausbildung eines fibroblastenähnlichen Zellrasens, auf welchem sich die angereicherten PBCs in Clustern (= Kardiosphären) absiedelten (Messina et al. 2004) (Abb. 3). Nach einer Anzuchtphase von insgesamt sechs Wochen wurden die Zellkulturen im Durchlicht alle zwei Tage makro- und mikroskopisch begutachtet (Abb. 3 und 4). Dabei wurden die Zellkulturen auf mögliche Kontamination analysiert und das mögliche Auswandern von PBCs fotografisch dokumentiert. Diese Kardiosphären bilden nun die Zytokine, welche in vorangegangenen Versuchen (Krehbiel 2010) isoliert und identifiziert wurden. In der vorliegenden Arbeit sollten vier der dort detektierten Zytokine (IL-6, IL-8, MCP-1, GDF-15) sowie TIMP-1 genauer untersucht werden.



**Abbildung 3: Aus „phase-bright cells“ (PBCs) zusammengesetzte Kardiosphären**

Humanes kardiales Gewebe wurde nach dem Protokoll von Messina et al. (2004) bearbeitet und über vier Wochen kultiviert. Nach Trypsinierung schlossen sich sogenannte „phase-bright cells“ (PBCs) zu Clustern zusammen und bildeten die Kardiosphären. Bild zweier als „Kardiosphären“ bezeichneter Zellcluster verschiedener kardialer Progenitorzellkulturen zwei Wochen nach Trypsinierung und Kultivierung in „Medium nach Trypsinieren“.

## Methoden



**Abbildung 4: Humane Primärkultur von Kardiosphären auf Fibroblastenreichem Zellrasen**

Nach sechswöchiger Anzuchtphase und Anreicherung fanden sich aus „phase bright cells“ zusammengesetzte clusterartige Strukturen (unten links) auf einem Zellrasen Fibroblasten-ähnlicher Zellen, die als „Kardiosphären“ bezeichnet werden.

### 3.2.4 Gewinnung der Überstände und Zellen für Western Blot Analysen

Nach der insgesamt sechswöchigen Kultivierungszeit wurden die Überstände der Primäkulturen bzw. Progenitorzellkulturen abpipettiert und - wenn nicht direkt weiterverarbeitet - bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Zellen selbst wurden zur Western Blot Analyse wie in Kap. 3.1.4 beschrieben isoliert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

### 3.2.5 Transfektion der Zellen mit short-interfering RNA

Um die Entwicklung der Progenitorzellkultur und vor allem die möglichen Effekte der erhaltenen Kulturüberstände (bzw. deren Zytokine) auf die Funktion einzelner, frisch isolierter Kardiomyozyten des Rattenherzens unter Ausschluss einer Beteiligung von IL-6 untersuchen zu können, wurden Zellen der humanen Progenitorzellkulturen mit IL-6 spezifischer short-interfering RNA (siRNA) behandelt. Bei siRNA handelt es sich um kurze (19 - 25 Basen(paare)), nicht-kodierende, einzel- oder doppelsträngige RNA-Moleküle, die an komplementäre einzelsträngige mRNA Moleküle binden und somit deren posttranskriptionale Funktion unterbinden (Elbashir et al., 2001; Sledz and Williams, 2005). Die zellulär aufgenommene IL-6 spezifische siRNA sollte also dazu dienen, die Expression dieses Zytokins in den Progenitorzellen zu hemmen bzw. verhindern. Zur Erkennung der effizientesten siRNA wurden vier verschiedene siRNA-Sequenzen vorerst in der Konzentration von 5 nmol/l getestet. Um die optimale Auf-

## Methoden

nahme der siRNA in die Zellen zu ermöglichen, wurde eine Mischung aus kationischen und neutralen Lipiden (HiPerFect®) benötigt, die in drei unterschiedlichen Dosierungen getestet wurde. Um modulierende Effekte des HiPerFects® ausschließen zu können, wurde eine Zellkulturschale nur mit dieser Lösung versetzt. Es ergaben sich die in Tab. 6 angegebenen Konstellationen aus Kultur, siRNA und HiPerFect®:

**Tabelle 6: Versuchsschema zur Ermittlung der effizientesten siRNA und HiPerFect® Konzentrationen**

Es wurden insgesamt neun humane Progenitorzellkulturen angelegt. Zwei bzw. drei Progenitorzellkulturen wurde jeweils eine siRNA zugeordnet und in einer Konzentration von 5 nmol/l zugesetzt. Nach dem Trypsinieren (s. Kap.3.2.5) wurde der Zellanteil jeder Progenitorzellkulturschale in 20 kleine Zellkulturschalen überführt. Jeweils fünf kleine Zellkulturschalen erhielten dann eine definierte, über die restliche Kultivierungszeit beständig bleibende Menge an HiPerFect®.

siRNA	Kultur	Konzentration der IL-6 spezifischen siRNA	Menge des HiPerFect® pro Zellkulturschale
Hs_IL6_5	1	5 nmol/l	0 µl – 1,5 µl – 3,0 µl – 4,5 µl
	2	5 nmol/l	0 µl – 1,5 µl – 3,0 µl – 4,5 µl
Hs_IL6_6	1	5 nmol/l	0 µl – 1,5 µl – 3,0 µl – 4,5 µl
	2	5 nmol/l	0 µl – 1,5 µl – 3,0 µl – 4,5 µl
	3	5 nmol/l	0 µl – 1,5 µl – 3,0 µl – 4,5 µl
Hs_IL6_1	1	5 nmol/l	0 µl – 1,5 µl – 3,0 µl – 4,5 µl
	2	5 nmol/l	0 µl – 1,5 µl – 3,0 µl – 4,5 µl
Hs_IL6_2	1	5 nmol/l	0 µl – 1,5 µl – 3,0 µl – 4,5 µl
	2	5 nmol/l	0 µl – 1,5 µl – 3,0 µl – 4,5 µl

Im weiteren Verlauf der Versuche stellte sich allerdings heraus, dass die Konzentration von 5 nmol/l für die hier verwendeten Zellkulturen zu gering war um Effekte zu erzielen. Auf Empfehlung der Herstellerfirma der siRNA (Fa. Quiagen®) wurde die Dosierung der siRNA auf 25 nmol/l, 50 nmol/l und 75 nmol/l je Zellkulturschale angehoben, so dass für die unten genannten Kulturen die folgenden Konzentrationen der am besten wirksamsten siRNA Hs\_IL6\_2 eingesetzt wurden.

**Tabelle 7: Versuchsschema zur Ermittlung der effizientesten siRNA-Konzentration**

Es wurden insgesamt fünf humane Progenitorzellkulturen angelegt. Alle wurden mit der siRNA Hs\_IL6\_2 in den folgenden Konzentrationen und 4,5 µl HiPerFect® inkubiert. Nach dem Trypsinieren (s. Kap.3.2.5) wurde der Zellanteil jeder Progenitorzellkulturschale in 20 kleine Zellkulturschalen überführt. Jeweils fünf kleine Zellkulturschalen erhielten

## Methoden

dann eine definierte, über die restliche Kultivierungszeit beständig bleibende Menge an HiPerFect®.

<b>Kultur</b>	<b>Benennung der je fünf Zellkulturschalen</b>	<b>Zusatz Konzentration siRNA zu den Zellkulturschalen</b>
H191	Kontrolle	Kein Zusatz
	H191 - 25	25 nmol/l siRNA
	H191 - 50	50 nmol/l siRNA
	H191 - 75	75 nmol/l siRNA
H202	Kontrolle	Kein Zusatz
	H202 - 25	25 nmol/l siRNA
	H202 - 50	50 nmol/l siRNA
	H202 - 75	75 nmol/l siRNA
H203	Kontrolle	Kein Zusatz
	H203 - 25	25 nmol/l siRNA
	H203 - 50	50 nmol/l siRNA
	H203 - 75	75 nmol/l siRNA
H206	Kontrolle	Kein Zusatz
	H206 - 25	25 nmol/l siRNA
	H206 - 50	50 nmol/l siRNA
	H206 - 75	75 nmol/l siRNA
H204a	Kontrolle	Kein Zusatz
	H204a - 25	25 nmol/l siRNA
	H204a - 50	50 nmol/l siRNA
	H204a - 75	75 nmol/l siRNA

Für jede siRNA wurden zwei bzw. drei Kulturen eingesetzt. Der Tag der Trypsinierung galt als Tag Null. Dabei wurden die Zellen aus der 30 ml Zellkulturschale (BD, Falcon 353003) in 20 Zellkulturschalen à 1,0 ml umgesetzt. Nach Austausch der Hälfte des Mediums an Tag zwei, vier und sechs nach Trypsinierung erfolgte die Transfektion mit siRNA an Tag acht. Durch Zugabe einer bestimmten siRNA Konzentration und HiPerFect® Menge (0 - 4,5 µl) ergaben sich die in Tab 6 angegebenen Versuchsansätze. Pro siRNA- und HiPerFect®-Versuchsansatz wurden demzufolge fünf Zellkulturschalen à 1,0 ml genutzt. Das „Transfektionsmedium“, in welches siRNA und HiPerFect® aufgenommen wurden, stellte das „Medium nach Trypsinieren“ ohne feta-

## Methoden

les Kälberserum (FCS) dar; es sollten so Wechselwirkungen des FCS mit der siRNA vermieden werden. Dem Transfektionsmedium der einzelnen Versuchsansätze wurde nun die siRNA in unterschiedlicher Menge pro Zellkulturschale zugesetzt. Anschließend wurde jeder Zellkulturschale das in Tab. 6 aufgeführte HiPerFect®-Volumen zugegeben und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert; dies führte zur Komplexierung der siRNA mit HiPerFect®.

Tropfenweise wurde die Suspension aus siRNA und HiPerFect® dann zu den einzelnen Zellkulturschalen gegeben und diese vorsichtig geschwenkt. Als Kontrolle dienten Schalen, welche nur mit Medium beladen wurden. Am Tag neun wurde das komplette Medium der Zellen erneuert. Am Tag elf erfolgte ein Tausch der Hälfte des Mediums und eine erneute Transfektion mit siRNA nach dem oben genannten Protokoll. Am Tag 13 wurden die Überstände (Medium und die darin enthaltenen gelösten Stoffe) und die Zellen für die Proteinbestimmung (s. Kap. 3.3) und den Immunoassay (s. Kap. 3.4) isoliert.

### 3.2.6 Stimulation der Zellkultur mit Zytokinen

Um mögliche modulierende Effekte von Zytokinen auf das Wachstum der human- und Ratten-spezifischen, kardialen Progenitorzellkulturen (CPC-Kulturen) zu untersuchen, wurden diese mit recombinant rat IL-6 (IL-6), recombinant human IL-8 (IL-8) und recombinant human MCP-1/CCL2 (MCP-1) stimuliert. Der jeweiligen Kontrolle wurden keine Zytokine zugesetzt. Nach dem Trypsinieren wurden die Zellkulturschalen in eine IL-6, eine IL-8 und eine MCP-1 Gruppe eingeteilt. In der IL-6 Gruppe wurden jeder Zellkulturschale 10 ng/ml IL-6 zugefügt, der IL-8 Gruppe je 1 ng/ml IL-8 und der MCP-1 Gruppe je 100 ng/ml MCP-1. Die gewählten Endkonzentrationen stellten die jeweils geringsten dar, die zu einer signifikanten Zunahme der kontraktile Funktion isolierter Kardiomyozyten der Ratte führten (s. Kap. 4.10; Ausnahme GDF-15, da hier keine Konzentration signifikante Effekte erzielte). Bei den Waschvorgängen wurde den Zellen jeweils die Hälfte des alten Mediums entzogen und durch die gleiche Menge frischen Mediums ersetzt. Bei jedem dieser Vorgänge wurde das entsprechende Zytokin in oben genannter Konzentration der entsprechenden Zellkulturschale direkt erneut zugegeben. Nach zwei Wochen wurden Überstand und Zellen abpipettiert, um modulierende Effekte auf einzelne Kardiomyozyten der Ratte untersuchen zu können.

### 3.3 Western blot Analyse

Die elektrophoretische Auftrennung eines Proteingemisches in einem Polyacrylamidgel (= PAGE) wird als „Western blot“ bezeichnet und dient der Identifizierung und semiquantitativen Analyse einzelner Proteine (Gosh et al. 2014). Die Proteinanalyse im Western blot findet dabei in aufeinander aufbauenden Schritten statt. Zu Beginn steht die elektrophoretische Auftrennung der Proteine in einem mit Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzten Polyacrylamidgel (= SDS-PAGE) (s. Kap. 3.3.1), gefolgt von der Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (s. Kap. 3.3.2). Zum Schluss erfolgt der immunologische Nachweis mittels spezifischer Antikörper gegen das gesuchte Protein (Towbin et al. 1979) (s. Kap. 3.3.3).

Der Western blot wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um die kardiomyozytenspezifischen Proteine SERCA (sarcoplasmatische Kalzium-ATPase), und NCX (sekundär aktiver Natrium-Kalzium Antiporter in der Zellmembran) semiquantitativ zu bestimmen, um daraus Rückschlüsse auf die durch Zytokineinwirkung modifizierte kontraktile Funktion der Kardiomyozyten ziehen zu können.

#### 3.3.1 SDS-haltige Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

##### 3.3.1.1 Gießen der Gele und Proteinaufarbeitung

Es wurden ein sogenanntes Trenngel und ein Sammelgel benötigt. In beiden Fällen handelt es sich um Polyacrylamidgele mit - je nach zu bestimmender Proteingröße - unterschiedlicher Acrylamidkonzentration. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein 5% Sammel- sowie ein 10% Trenngel benötigt. Die Bestandteile für die Gele wurden, wie im Material-Teil (Kap. 2.2.3) angegeben, angesetzt. Zwei Glasplatten wurden mit Profilverformern (Abstandhaltern; an drei von vier Seiten) aufeinandergelegt und mit Klemmen fixiert. Dem Abdichten der Ränder mit Agarose folgte das Auffüllen mit Trenngel bis 2,5 cm unterhalb des Randes. Darauf wurde das Sammelgel gegossen, in welches der Teflonkamm, welcher die Proteintaschen bildete, eingesetzt wurde. Die zuvor isolierten Proben der Kardiomyozyten (105 µl Kardiomyozyten mit 100 µl „Proteinisolutionslösung“ und 5 µl Benzonase®; s. Kap. 3.1.4) wurden mit 40 µl 4x Laemmli-Puffer vermischt und konnten so bei -20°C und gegebenenfalls auch bei -80°C aufbewahrt werden.

##### 3.3.1.2 SDS-PAGE

Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung diente dieses Verfahren der Auftrennung kardiomyozytenspezifischer Proteine, basierend auf den Molekulargewichten der Proteine SERCA (92 Kilodalton = kDa),  $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter (NCX) in der Zellmemb-

## Methoden

ran (65 kDa) und  $\beta$ -Aktin (42 kDa) als Bezugsprotein („house keeping“ Protein). Zwei der hergestellten Gele wurden luftblasenfrei in einer sog. Laufkammer positioniert und fixiert; die Kammer wurde mit Laufpuffer beladen, bis die „Taschen“ des Teflonkammes für die Proben in Laemmli-Puffer gefüllt waren.

Die zu untersuchenden Proteinproben (gelöst in Laemmli-Puffer) wurden für fünf Minuten bei 95°C erhitzt und anschließend bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. In die erste Geltasche wurden 10  $\mu$ l eines Rainbow-Markers pipettiert, der zur Kalibrierung der Molekulargewichte einzelner Proteine für die nach elektrophoretischer Auftrennung eines Proteingemisches erhaltenen Proteinbanden diene. In die weiteren Geltaschen wurden jeweils 40  $\mu$ l einer Proteinprobe pipettiert. Bei einer Spannung von max. 165 V wurden die mit SDS „ummantelten“ Proteine über drei Stunden im elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt.

### 3.3.2 Blotting der Proteine auf Membranen

In der Semidry-Blotkammer wurden die elektrophoretisch getrennten Proteine aus dem Acrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, ein Vorgang, den man als Blotten (engl.: blotting) bezeichnet (Kyhse-Andersen 1984). Dazu wurde die Kammer mit Blotpuffer-getränktem Filterpapier ausgelegt, auf welches die Nitrozellulosemembran aufgebracht wurde. Darauf wiederum wurde das vom Sammelgel befreite Trenngel transferiert. Den Abschluss bildete erneut eine Lage Filterpapier. Dieses „sandwich“ musste luftblasenfrei unter leichtem Druck zusammengepresst werden. Nach Verschluss der Blotkammer wurde eine Stromstärke von 105 mA angelegt. Die Proteine wurden so elektrophoretisch aus dem Gel auf die Membran übertragen. Nach 90 Minuten wurde die Membran entnommen und über Nacht zum Trocknen unter einem Abzug gelagert.

### 3.3.3 Immunologischer Nachweis

#### 3.3.3.1 Markierung der Proteine auf der Blotmembran

Um sicherzustellen, dass die Blotmembran gleichmäßig mit Protein beladen worden war, wurde eine Gesamtproteinfärbung mit Ponceau S durchgeführt (Taylor et al. 2014). Um freie, unspezifische Proteinbindungsstellen der Antigen-spezifischen Antikörper zu blockieren, wurde die Membran für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit 5% hochreinem (grade V) Rinderserumalbumin (BSA) inkubiert und luftblasenfrei eingeschweißt.

## Methoden

### 3.3.3.2 Darstellung der Proteine auf der Blotmembran

Für den semiquantitativen Nachweis einzelner transferierter Proteine wurden die Nitrozellulosemembranen mit primären Antikörpern gegen SERCA (1:200), NCX (1:200) sowie dem Antikörper gegen das „house keeping“ Protein  $\beta$ -Aktin (1:1000), jeweils gelöst in 1\*TTBS mit 5% BSA, inkubiert. Aufgrund der relativ geringen Differenz der Molekulargewichte für  $\beta$ -Aktin und NCX, und der damit eng zusammenliegenden Proteinbande von  $\beta$ -Aktin und NCX, wurde jeweils eine Membran mit den Antikörpern gegen SERCA und  $\beta$ -Aktin beladen, während eine zweite mit dem Antikörper gegen NCX beladen wurde. Die Membranen wurden in Gegenwart entweder des NCX-Antikörpers bzw. des  $\beta$ -Aktin / SERCA Antikörper-Mixes luftblasenfrei über Nacht bei 4°C auf einem Taumler inkubiert. Es folgte eine dreimalige Waschung mit TTBS, um ungebundene Antikörper zu entfernen.

Um die Gelbanden der Proteine SERCA, NCX und  $\beta$ -Aktin sichtbar zu machen und semiquantitativ auswerten zu können, mussten die Primärantikörper „farblich markiert“ werden. Dies geschah durch die Bindung eines mit einer alkalischen Phosphatase markierten Sekundärantikörpers an den jeweiligen Primärantikörper. Als Sekundärantikörper für  $\beta$ -Aktin und NCX kam ein goat anti-rabbit-IgG Antikörper (1:2.500) zum Einsatz und für SERCA ein rabbit anti-goat-IgG Antikörper (1:5.000), gelöst in 1\* TTBS und 5,0% BSA. Die Inkubation der Nitrozellulosemembran mit den Sekundärantikörpern erfolgte bei Raumtemperatur über zwei Stunden. Es folgte eine Waschung der Membranen und anschließend deren Färbung mit einer Kombination aus BCIP und NBT (s. Kap. 2.2.3). Die alkalische Phosphatase dephosphoryliert dabei BCIP als Substrat, welches zu einem Farbumschlag führt, der durch das Oxidationsmittel NBT zusätzlich verstärkt wird. Die somit sichtbaren Proteinbanden wurden im Multimage light cabinet® fotografiert und das entstandene Bild digital gespeichert.

### 3.3.4 Auswertung der Western blots

Die Auswertung der Western blots wurde mit Hilfe des Programmes AlphaDigiDoc™ durchgeführt, wobei nach immunologischer Detektion der Proteinbanden deren optische Dichte spektrophotometrisch in der Blotmembran vermessen wurde. Im Rahmen der abschließenden Auswertung wurden die optischen Dichten der immunologisch detektierten Proteinbanden für SERCA und NCX jeweils auf diejenige des  $\beta$ -Aktin bezogen bzw. deren Verhältnisse mittels Microsoft Excel® berechnet. Die Präsentation der aus den Western blots gewonnenen Daten erfolgte als prozentuale Veränderung des SERCA:NCX Expressionsverhältnisses in Zytokin-behandelten *versus* unbehandelten Kardiomyozytenkulturen, unter Angabe der aus Mehrfachbestimmungen errechneten

## Methoden

Mittelwerte und deren Standardfehlers des Mittelwertes (SEM). Für den statistischen Vergleich wurden unterschiedliche Datensätze mit Hilfe des Statistik-Programmes SPSS und Microsoft Excel® einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen, inklusive eines post-hoc Tests nach Bonferroni. Unterschiede zwischen den Mittelwerten der SERCA:NCX Expressionsverhältnisse bei einzelnen Teilstudien wurden auf folgende Signifikanzniveaus getestet:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++) oder  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

### 3.4 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Ein „sandwich enzyme linked immunosorbent assay“ (DuoSet IL-6 ELISA, R & D Systems) wurde zum quantitativen Nachweis von IL-6 in den Überständen der mit IL-6 siRNA behandelten CPC-Kulturen verwendet. Hierzu wurden 96-Well Platten (Carl Roth GmbH) mit 100 µl des capture Antikörpers (1:180 Verdünnung mit dem Verdünnungs-Reagenten) je Loch beschichtet, abgedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am Folgetag wurde die Platte mit 400 µl je Loch Waschpuffer gewaschen und mit 300 µl des Verdünnungsreagenz (1,0% BSA in PBS) versetzt, abgedeckt und erneut für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die Standardreihe angesetzt, anhand derer später die IL-6 Konzentrationen im Zellkulturüberstand errechnet werden konnten. Hierzu wurde der im Kit mitgelieferte IL-6 Standard in sechs aufeinanderfolgenden 1:2 Stufen mit dem Verdünnungs-Reagenten verdünnt, so dass sich in 100 µl Lösung je 600, 300, 150, 75, 37,5, 18,8 bzw. 9,4 Pikogramm (pg) rekombinantes IL-6 befanden. Inklusiv der IL-6 freien Nullprobe lagen somit acht IL-6 Standardlösungen vor. Die zu untersuchenden Proben (CPC-Kulturüberstand) wurden 1:1000 (Erfahrungswert) mit dem Verdünnungs-Reagenten verdünnt.

Nach Inkubation der 96-Well Platten mit dem capture Antikörper wurden je 100 µl des Standards im Doppelansatz und je 100 µl der Proben im Dreifachansatz in die Wells pipettiert und die Platten abgedeckt. Nach einer zweistündigen Inkubationszeit wurden die Platten mit 400 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend je Well 100 µl des biotinylierten Detektions-Antikörpers (1:180 mit dem Verdünnungs-Reagenten) dazugegeben. Es folgte eine weitere zweistündige Inkubationszeit und eine Waschung mit 400 µl Verdünnungs-Reagenten. Die Streptavidin-gekoppelte horseradish peroxidase (HRP), 1:40 mit dem Verdünnungs-Reagenten verdünnt, diente aufgrund der hochaffinen Bindung des Streptavidins für das Biotin des Detektionsantikörpers als Marker (Stayton et al., 1999). Es wurde jeweils 100 µl der Streptavidin HRP-Lösung zur Pro-

## Methoden

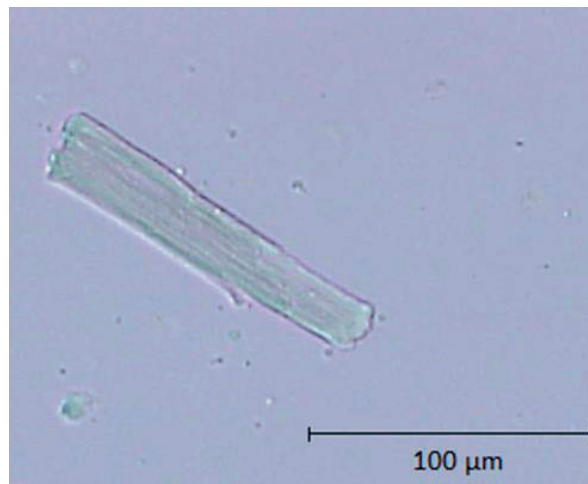
be bzw. dem Standard in die Wells pipettiert. Nach einer zwanzigminütigen Inkubationszeit im Dunklen bei Raumtemperatur erfolgte eine weitere Waschung mit 400 µl Waschpuffer. Die Zugabe von je 100 µl zweier Farbreagenten („substrate solution“, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Tetramethylbenzidin, s. Kap. 2.2.5) führte in der folgenden zwanzigminütigen Inkubationszeit - ebenfalls im Dunklen – durch die enzymatische Wirkung der Peroxidase zu einer Farbreaktion. Die Reaktion wurde mittels Zugabe von je 50 µl 2 N Schwefelsäure gestoppt.

Für die semiquantitative Erfassung des Antikörper-komplexierten IL-6 aufgrund der final durchgeführten enzymatischen HRP-Reaktion wurden die optischen Dichten der Standard- sowie Probenlösungen durch Extinktionsmessungen bei 450 und 550 nm im ELISA-Reader spektrophotometrisch erfasst, eine Standardkurve erstellt und die IL-6-Konzentrationen in den Proben aufgrund deren Absorption bei den genannten Wellenlängen ermittelt. Die Auswertung der Daten erfolgte in Excel®. Im Ergebnisteil werden IL-6 Daten lediglich als Mittelwerte der Dreifachbestimmungen angegeben. Aufgrund der geringen Probenanzahl wurde auf eine statistische Auswertung der Daten verzichtet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Wirkung einzelner Zytokine auf isolierte Kardiomyozyten normotensiver Ratten

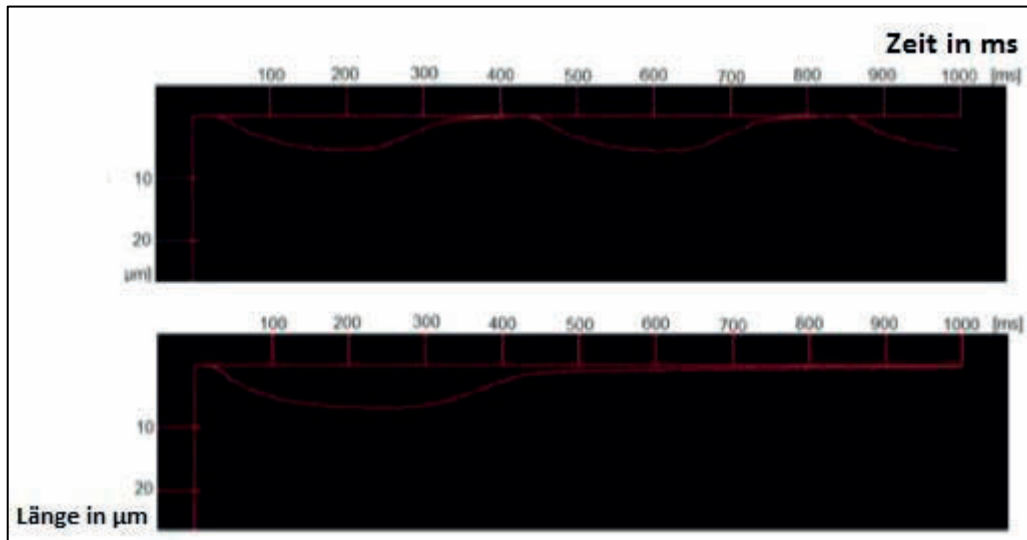
Ziel dieser Versuchsreihe war es, die Wirkung fünf verschiedener Zytokine bzw. Mediatoren (IL-6, IL-8, MCP-1, GDF-15, TIMP-1) in logarithmisch steigender Konzentration auf isolierte Kardiomyozyten der normotensiven Wistar-Ratte zu untersuchen und nachfolgend Dosis-Wirkungs-Beziehungen zu erstellen. Die Vermessung der Kardiomyozyten im elektrischen Feld erfolgte mit der in Kap. 3.1.3 beschriebenen Geräteanordnung bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen, wobei im Wesentlichen der  $\Delta L/L$ -% Wert analysiert wurde. Da der Grad der kontraktile Antwort bei der Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz am ausgeprägtesten war und zudem in der Fachliteratur myokardiale Zellen zumeist in dieser Frequenz stimuliert wurden (Anwar et al. 2008, Engel 2008, Maxeiner et al. 2010, Müller 2010), werden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Ergebnisse bei 0,5 Hz Stimulation dargestellt. Dabei wurde jeweils der Mittelwert ( $\pm$  SEM) aller  $\Delta L/L$ -% Werte in Zellkulturschalen ohne Zytokinapplikation als Nullwert (= Kontrolle) gesetzt. Pro Kardiomyozytenpräparation (Rattenherz) konnten bis zu 24 Zellkulturschalen mit Herzmuskelzellen gewonnen werden, und pro Zytokinkonzentration ( $n = 5$ ) sowie Kontrollwert kamen zwei bis vier Zellkulturschalen zum Einsatz.



**Abbildung 5:** Isolierte Kardiomyozyte einer Wistar-Hannover-Ratte  
Mit freundlicher Genehmigung von Franziska Nippert.

## Ergebnisse

In jeder Zellkulturschale wurden im elektrischen Feld fünf bis zehn Herzmuskelzellen repetitiv ( $n = 4$ ) vermessen. Dabei wurde deren durch Zytokinwirkung modulierte kontraktile Funktion als prozentuale Veränderung der Zelllänge ( $\Delta L$ ,  $\mu\text{m}$ , Ordinate) in Abhängigkeit von der Zeit ( $t$ ,  $\text{ms}$ , Abszisse) oszilloskopisch dargestellt (Abb. 6). Mittels der Software MUCEL® (Scientific) wurden die jeweiligen  $\Delta L/L$ -% Werte berechnet und digital gespeichert.



**Abbildung 6: Darstellung der Verkürzung einzelner isolierter Kardiomyozyten im elektrischen Feld**

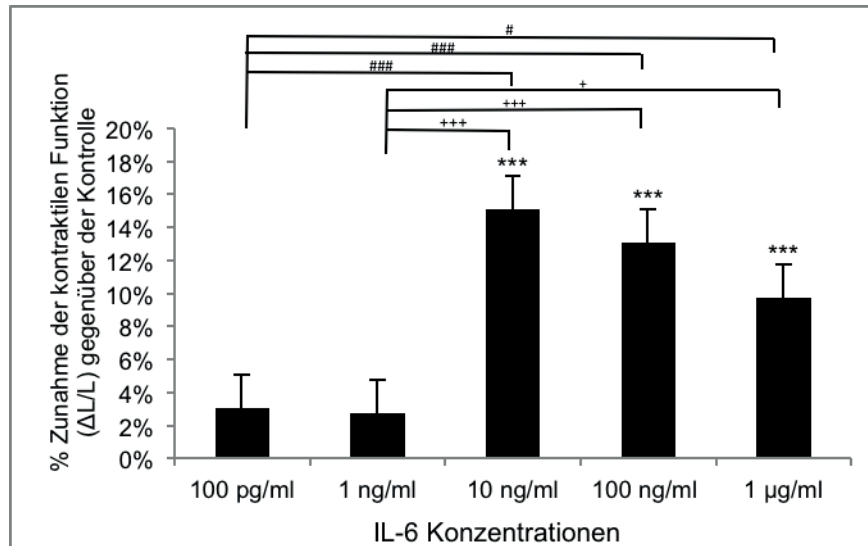
Zeit-Verkürzungs Diagramme einer kultivierten Kardiomyozyte des Rattenherzens, dargestellt und analysiert mit dem Programm MUCEL® (Scientific) in Form einer Sinuskurve ( $\mu\text{m}/\text{ms}$ ). Die obere Kurve zeigt die Kontraktion einer Kardiomyozyte bei 2 Hz, die untere Kurve bei 0,5 Hz. Auf der X-Achse ist die Zeit in ms angegeben, auf der Y-Achse Verkürzung der Kardiomyozyten in  $\mu\text{m}$ .

### 4.1.1 Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) repräsentiert eines der wichtigsten pro-inflammatorischen Zytokine. In die finale Analyse gingen, je nach Konzentration des Zytokins, 80 - 142 Kardiomyozyten aus 15 - 20 Zellkulturschalen (fünf Präparationen) ein. Während sich IL-6 in niedriger Konzentration (100  $\text{pg}/\text{ml}$  und 1  $\text{ng}/\text{ml}$ ) als unwirksam erwies, die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten normotoner Wistar-Hannover-Ratten zu beeinflussen, führte die Inkubation mit IL-6 in höheren Konzentrationen (10  $\text{ng}/\text{ml}$ , 100  $\text{ng}/\text{ml}$  resp. 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zu einer hochsignifikanten Zunahme der  $\Delta L/L$ -% Werte um  $15,1\% \pm 2,3\%$ ,  $13,1\% \pm 2,3\%$  resp.  $9,7\% \pm 2,7\%$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe (Abb. 7). Im direkten Vergleich untereinander konnten signifikante bis hoch signifikante Unterschiede zwischen den Effekten der drei hohen zu denen der beiden niedrigen

## Ergebnisse

IL-6 Konzentrationen errechnet werden (Statistikprogramm GraphPad®), nicht jedoch zwischen den Effekten der höheren Konzentrationen untereinander. Dies deutet auf eine klassische Sättigungskinetik der IL-6 Wirkung mit halbmaximalen  $K_m$ -Werten im Konzentrationsbereich von 1 - 10 ng/ml IL-6 hin (Abb. 7). In der vorliegenden Arbeit sollte IL-6 zum zentralen Zytokin werden.



**Abbildung 7: Einfluss von Interleukin-6 auf die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten normotensiver Ratten in der Primärkultur**

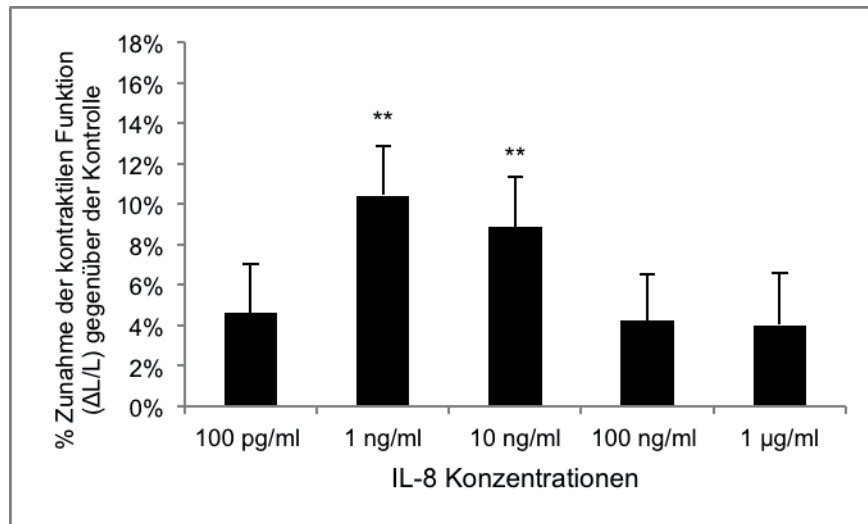
Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher normotensiver Wistar-Hannover-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit Interleukin-6 (IL-6) in logarithmisch steigender Konzentration. Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Dargestellt ist der Einfluss von IL-6 auf die kontraktile Funktion ( $\Delta L/L$ -%) nach Elektrostimulation (0,5 Hz, 20 V, 5 ms) von jeweils 80 - 142 Kardiomyozyten; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0  $\Delta L/L$ -% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM mittels einfaktorieller ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

### 4.1.2 Interleukin-8

Das CXC-Chemokin Interleukin-8 (IL-8) stellt einen potenten chemotaktischen Faktor dar. Je nach Konzentration von IL-8 gingen 96 - 106 Kardiomyozyten aus 14 - 16 Zellkulturschalen (vier Präparationen) in die finale Datenauswertung ein. Die Inkubation der Kardiomyozyten-Primärkultur mit IL-8 in Konzentrationen von 1 ng/ml bzw. 10 ng/ml bewirkte während Elektrostimulation (0,5 Hz, 20 mV, 5 ms) eine signifikante Zunahme der systolischen Verkürzung der Kardiomyozyten um  $10,4\% \pm 2,4\%$  bzw.  $8,9\% \pm 2,5\%$  (Abb. 8) im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Zytokinapplikation. Die minimal effektive IL-8 Dosis (1 ng/ml) lag somit um eine Zehnerpotenz niedriger als für IL-6 (10 ng/ml). Bedingt durch die recht ausgeprägte Streuung der einzelnen Mess-

## Ergebnisse

werte (bei hoher Anzahl untersuchter Zellen) ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den  $\Delta L/L$ -% Werten in Anwesenheit hoher (100 ng/ml bzw. 1  $\mu\text{g/ml}$ ) IL-8 Konzentrationen im direkten Vergleich mit den Kontrollwerten und Stimulation mit der niedrigen IL-8 Konzentration (100 pg/ml). Die Dosis-Wirkungs-Beziehung weist folgerichtig die Form einer Glockenkurve auf (Abb. 8).



**Abbildung 8: Einfluss von Interleukin-8 auf die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten normotensiver Ratten in der Primärkultur**

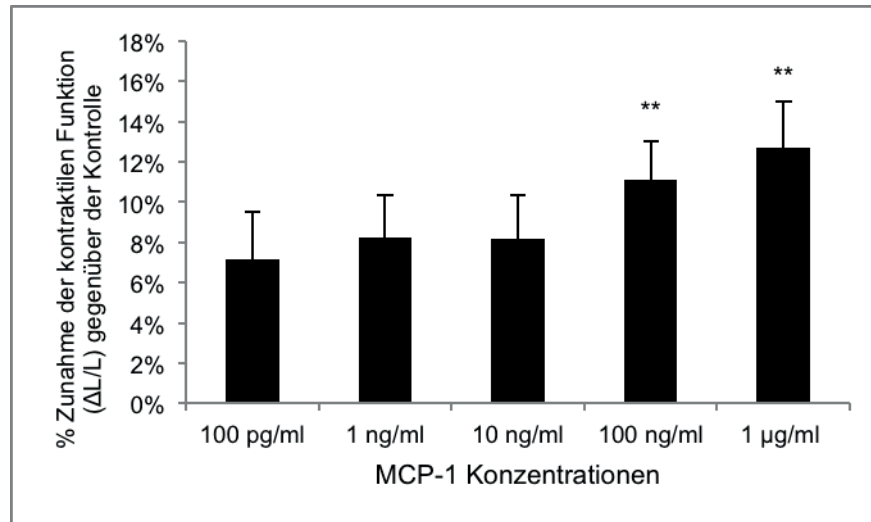
Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher normotensiver Wistar-Hannover-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit Interleukin-8 (IL-8) in logarithmisch steigender Konzentration. Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Dargestellt ist der Einfluss von IL-8 auf die kontraktile Funktion ( $\Delta L/L$ -%) nach Elektrostimulation (0,5 Hz, 20 V, 5 ms) von jeweils 96 - 106 Kardiomyozyten; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0  $\Delta L/L$ -% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM mittels einfaktorieller ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

### 4.1.3 Monocyte chemoattractant protein-1

Das Chemokin „monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1) ist generell bedeutsam für die Diapedese immunkompetenter Zellen. Zudem wird ihm eine entscheidende Funktion im Rahmen des kardialen „Remodeling“ zugeschrieben (Chen and Frangogiannis 2016). Es wurden jeweils 58 - 86 Kardiomyozyten aus zehn bis zwölf Zellkulturschalen (drei Präparationen) in die Endauswertung einbezogen. Die Versuchsreihe zeigte, dass lediglich hohe MCP-1 Konzentrationen (100 ng/ml resp. 1  $\mu\text{g/ml}$ ) die kontraktile Funktion primärer Kardiomyozyten signifikant gegenüber der Kontrollgruppe um  $11,9\% \pm 1,9\%$  resp.  $11,7\% \pm 2,4\%$  zu steigern vermochten (Abb. 9). Wiederum bedingt durch die ausgeprägte Streuung der einzelnen Messwerte

## Ergebnisse

(und damit des jeweiligen SEM-Wertes) konnten für die niedrigeren MCP-1 Konzentrationen ebenfalls im Vergleich zur Kontrollgruppe bzw. der verschiedenen Zellgruppen untereinander keine signifikant unterschiedlichen Mittelwerte errechnet werden (Abb. 9).



**Abbildung 9: Einfluss von MCP-1 auf die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten normotensiver Ratten in der Primärkultur**

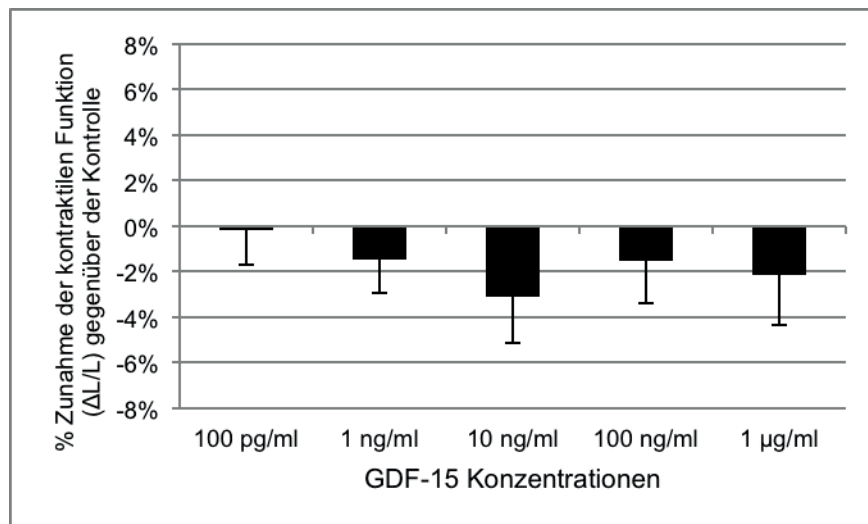
Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher normotensiver Wistar-Hannover-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit „monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1) in logarithmisch steigender Konzentration. Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Dargestellt ist der Einfluss von MCP-1 auf die kontraktile Funktion ( $\Delta L/L$ -%) nach Elektrostimulation (0,5 Hz, 20 V, 5 ms) von jeweils 58 - 86 Kardiomyozyten; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0  $\Delta L/L$ -% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM mittels einfaktorieller ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

### 4.1.4 Growth and differentiation factor-15

Der zur Familie der „transforming growth factors“ gehörende „growth and differentiation factor-15“ (GDF-15) könnte möglicherweise bei Herzerkrankungen kardioprotektiv wirken (Garrido et al. 2017). Die Kontraktionsstudien an primären Kardiomyozyten normotensiver Ratten betreffend, wurden insgesamt Daten an 144 - 192 Kardiomyozyten aus 24 - 28 Zellkulturschalen (sieben Präparationen) erhoben und analysiert. Im Gegensatz zu den anderen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Faktoren führte GDF-15 konzentrationsunabhängig nicht zu einer Steigerung, sondern einer marginalen, statistisch nicht signifikanten Verringerung der kontraktilen Funktion im direkten Vergleich zu Messungen an Kardiomyozyten in Abwesenheit von GDF-15 (Abb. 10). Keiner der mittels einfaktorieller ANOVA und post-hoc Test durchgeführten statisti-

## Ergebnisse

schen Vergleiche der verschiedenen Datensätze ergab Signifikanzen mit  $p \leq 0,05$ ; GDF-15 zeigte somit keine biologische Aktivität hinsichtlich der Modulation der kontraktile Funktion primärer Kardiomyozyten von normotensiven Ratten (Abb. 10).



**Abbildung 10: Einfluss von GDF-15 auf die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten normotensiver Ratten in der Primärkultur**

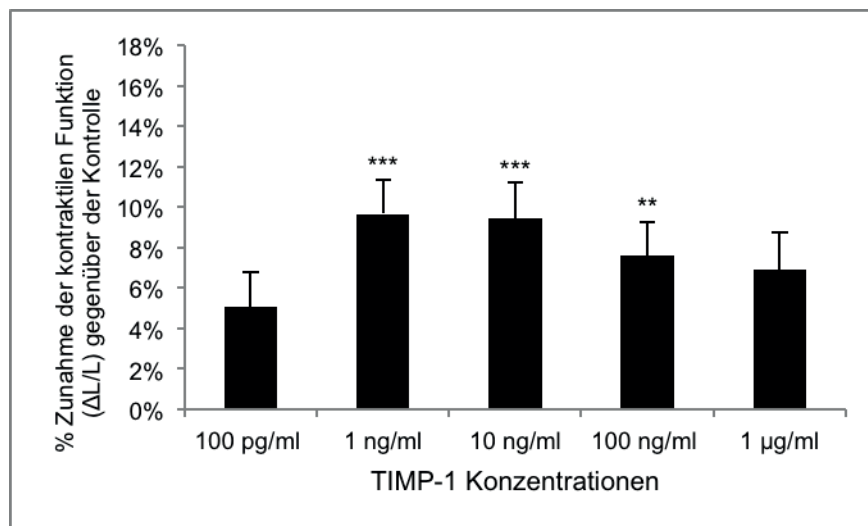
Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher normotensiver Wistar-Hannover-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit „growth and differentiation factor-15“ (GDF-15) in logarithmisch steigender Konzentration. Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Dargestellt ist der Einfluss von GDF-15 auf die kontraktile Funktion ( $\Delta L/L$ -%) nach Elektrostimulation (0,5 Hz, 20 V, 5 ms) von jeweils 144 - 192 Kardiomyozyten; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0  $\Delta L/L$ -% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM mittels einfaktorier ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

### 4.1.5 Tissue inhibitor of metalloproteinases-1

„Tissue inhibitor of metalloproteinases-1“ (TIMP-1) repräsentiert einen endogenen Inhibitor vor allem der Metalloproteinase MMP-9 u.a. im Rahmen des „Remodeling“ extrazellulärer Matrixkomponenten des Myokards (Uchinaka et al. 2014). In die finale Analyse gingen, je nach eingesetzter TIMP-1 Konzentration, 157 - 177 Kardiomyozyten aus 20 - 24 Zellkulturschalen (6 Präparationen) ein. Teilweise vergleichbar mit den für IL-8 erhaltenen Ergebnissen (Abb. 8) hatte die Inkubation der Kardiomyozyten mit TIMP-1 in Konzentrationen von 1, 10 bzw. 100 ng/ml eine hoch signifikante Steigerung der systolischen Verkürzung der Kardiomyozyten um  $9,7\% \pm 1,7\%$ ,  $9,5\% \pm 1,8\%$  bzw.  $7,6\% \pm 1,6\%$  gegenüber der Kontrollgruppe ohne TIMP-1 Einwirkung zur Folge (Abb. 11). Da die Konzentrationen 100 pg/ml und 1  $\mu\text{g/ml}$  zu keinem statistisch signifikanten Effekt führten, ergab sich als Dosis-Wirkung-Beziehung eine Glockenkurve mit

## Ergebnisse

optimaler mittlerer Wirkstoffkonzentration (Abb. 11). Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den  $\Delta L/L$ -% Werten in Anwesenheit mittlerer (1 - 100 ng/ml) TIMP-1 Konzentrationen im direkten Vergleich mit den  $\Delta L/L$ -% Werten bei Stimulation mit niedrig (100 pg/ml) bzw. hoch dosiertem (1  $\mu\text{g/ml}$ ) TIMP-1.



**Abbildung 11: Einfluss von TIMP-1 auf die kontraktile Funktion isolierter Kardiomyozyten normotensiver Ratten in der Primärkultur**

Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher normotensiver Wistar-Hannover-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit „tissue inhibitor of metalloproteinases-1“ (TIMP-1) in logarithmisch steigender Konzentration. Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Dargestellt ist der Einfluss von TIMP-1 auf die kontraktile Funktion ( $\Delta L/L$ -%) nach Elektrostimulation (0,5 Hz, 20 V, 5 ms) von jeweils 157 - 177 Kardiomyozyten; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0  $\Delta L/L$ -% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM mittels einfaktorieller ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

### 4.2 SERCA / NCX Expressionsverhältnis isolierter Kardiomyozyten normotensiver Ratten

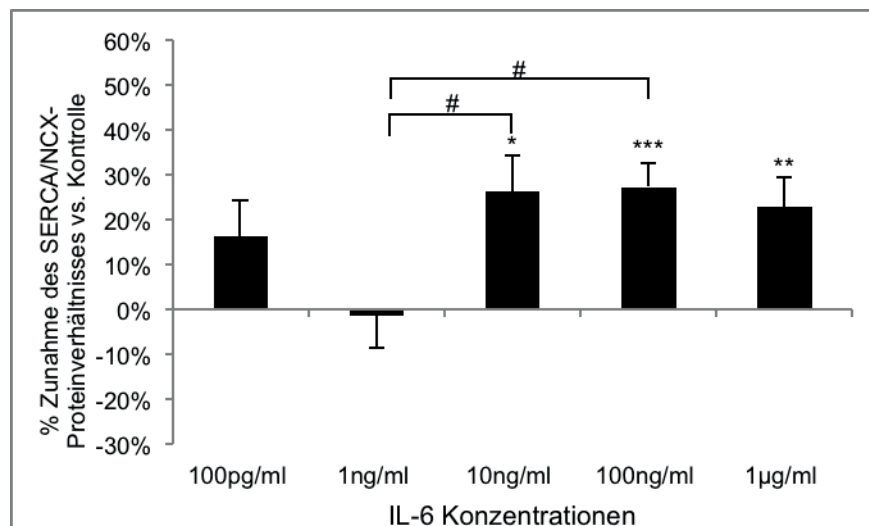
Als naheliegende Erklärung auf molekularer Ebene für die veränderte kontraktile Funktion kultivierter Kardiomyozyten normotensiver Hannover-Wistar-Ratten aufgrund der Inkubation mit Zytokinen (IL-6, IL-8, MCP-1, GDF-15) bzw. TIMP-1 könnte eine modulierte Expression der im *sarkoplasmatischen Retikulum* lokalisierten Kalzium-ATPase (SERCA) und des zellmembranalen Natrium-Kalzium Antiporters (NCX) sein. Für den immunologischen Proteinnachweis (SERCA, NCX) nach durchgeführter SDS-PAGE (siehe Kap. 3.3.1.2) wurden zuvor identisch stimulierte Zellen der Proteinextraktion unterzogen (siehe Kap. 2.2.3). Da der Western blot nicht dazu geeignet ist, Absolutwerte für die Expressionsraten von SERCA und NCX zu bestimmen, erfolgte ein relativer Vergleich der optischen Dichte. Die Stärke der Bande entsteht aufgrund

## Ergebnisse

einer farbkodierten Reaktion der an den jeweiligen Sekundärantikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase (siehe Kap. 3.3.3). Dabei wurde das jeweils auf  $\beta$ -Aktin normierte Expressionsverhältnis von SERCA zu NCX durch semiquantitative Analysen von Western blots als Messparameter berechnet (Anwar et al. 2008; Maxeiner et al. 2010).

### 4.2.1 Interleukin-6

Die Berechnung des SERCA / NCX-Expressionsverhältnisses für die mit IL-6 inkubierten Kardiomyozyten normotensiver Hannover-Wistar-Ratten aus 14 - 16 Zellkulturschalen (vier Präparationen) zeigte eine Erhöhung des SERCA / NCX Quotienten bei genau denjenigen Zytokinkonzentrationen, welche auch in der Messung der kontraktiven Funktion signifikante Ergebnisse erzielten (10 und 100 ng/ml sowie 1  $\mu$ g/ml) (Abb. 7). So führte IL-6 zu (hoch) signifikanten Steigerungen des SERCA / NCX Quotienten um  $26,3\% \pm 7,9\%$ ,  $27,2\% \pm 5,2\%$  sowie  $22,4\% \pm 6,5\%$  gegenüber sowohl den unstimulierten Kontrollwerten, als auch den Werten für die lediglich mit 1 ng/ml IL-6 inkubierten Zellkulturen (Abb. 12). Die für 100 pg/ml erzielten Daten erwiesen sich als nicht signifikant verändert gegenüber den Kontrollwerten (Abb. 12).



**Abbildung 12: Einfluss von Interleukin 6 auf die SERCA / NCX Expression in Kardiomyozyten normotensiver Ratten: Western blot Analyse**

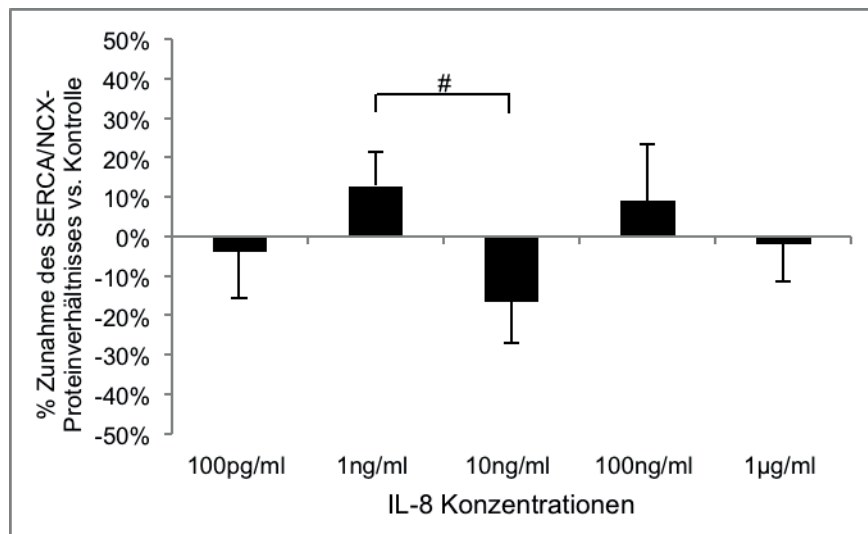
Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher normotensiver Wistar-Hannover-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit Interleukin 6 (IL-6) in logarithmisch steigender Konzentration. Als Kontrolle dienen unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Western blot Analysen für die Expression der Kalzium-ATPase (SERCA) und des Natrium-Kalzium Antiporters (NCX) mittels antigenspezifischer Primärantikörper und Sekundärantikörper-gekoppelter alkalischer Phosphatase-Reaktion. Dargestellt ist das Expressions-

## Ergebnisse

verhältnis SERCA / NCX, wobei  $\beta$ -Aktin jeweils als „house keeping“ Protein diente; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus vier Präparationen mittels einfaktorieller ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

### 4.2.2 Interleukin-8

Die in 14 - 16 Zellkulturschalen (vier Präparationen) durchgeführten Untersuchungen an mit IL-8 inkubierten Kardiomyozyten führten zu heterogenen Ergebnissen. Diese waren statistisch nicht signifikant gegenüber dem errechneten Mittelwert ( $\pm$  SEM) des SERCA / NCX Quotienten der Kontrolle (Abb. 13). Eine marginale Erhöhung bzw. Reduktion des SERCA / NCX Expressionsverhältnisses um  $12,7\% \pm 8,6\%$  (1 ng/ml IL-8) bzw.  $16,7\% \pm 10,5\%$  (10 ng/ml IL-8) konnte nicht in kausalen Zusammenhang mit den physiologischen Kontraktionsbestimmungen (Abb. 8) gebracht werden. In Abb. 14 ist ein repräsentativer Western blot dargestellt, der den fehlenden bzw. sehr limitierten Einfluss von logarithmisch steigender IL-8 Konzentration auf die Expression von SERCA, NCX sowie das als „house keeping“ Protein herangezogene  $\beta$ -Aktin zeigt.

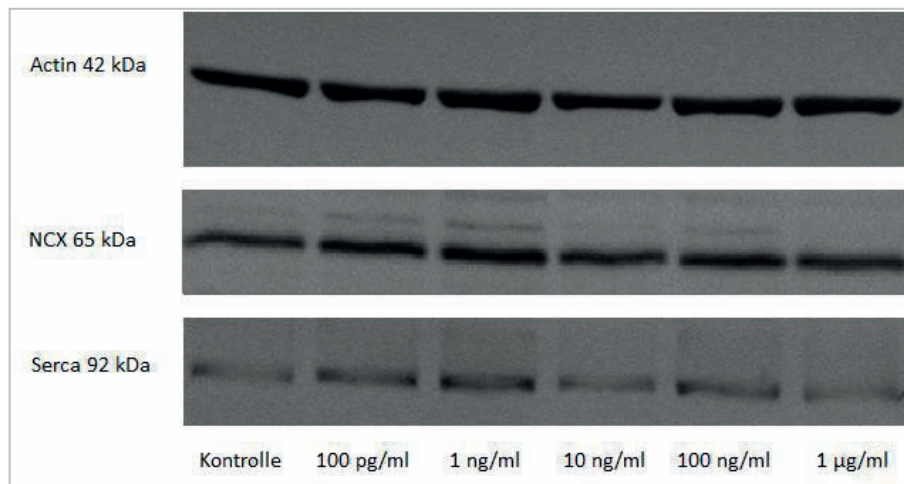


**Abbildung 13: Einfluss von Interleukin 8 auf die SERCA / NCX Expression in Kardiomyozyten normotensiver Ratten: Western blot Analyse**

Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher normotensiver Wistar-Hannover-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit Interleukin 8 (IL-8) in logarithmisch steigender Konzentration. Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Western blot Analysen für die Expression der Kalzium-ATPase (SERCA) und des Natrium-Kalzium Antiporters (NCX) mittels antigenspezifischer Primärantikörper und Sekundärantikörper-gekoppelter alkalischer Phosphatase-Reaktion. Dargestellt ist das Expressionsverhältnis SERCA / NCX, wobei  $\beta$ -Aktin jeweils als „house keeping“ Protein diente; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus vier Präparationen mittels einfaktorieller ANOVA und Bonferroni

## Ergebnisse

post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).



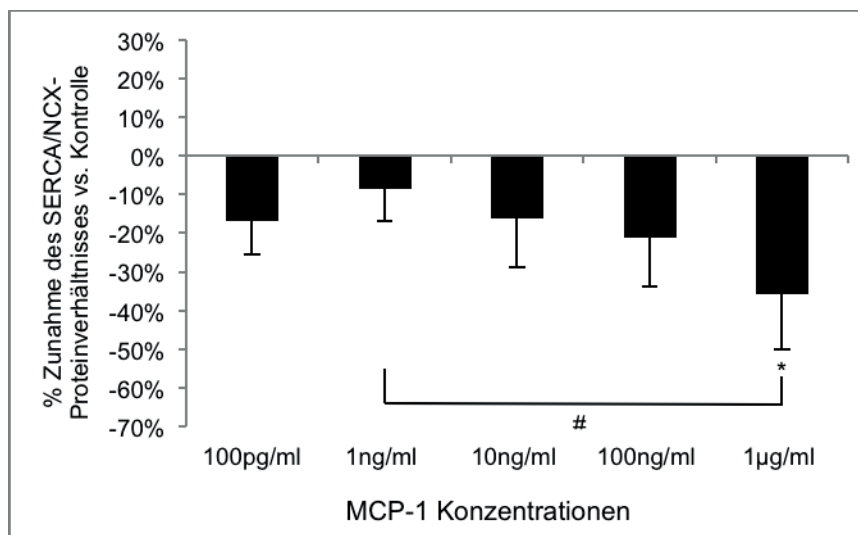
**Abbildung 14: Repräsentativer Western blot für die Expression von SERCA und NCX in IL-8 -stimulierten Kardiomyozyten normotensiver Ratten**

Elektrophoretische Auftrennung eines Proteinextraktes von für 24 Stunden in CCT-Medium mit Interleukin-8 (IL-8) in logarithmisch steigender Konzentration kultivierten und in Kontraktionsstudien charakterisierten Kardiomyozyten normotensiver Hannover-Wistar-Ratten im SDS-Polyacrylamidgel. Antigenmarkierung mittels spezifischer Primärantikörper für Kalzium ATPase (SERCA, MG = 92 kDa), Natrium-Kalzium Antiporter (NCX, MG = 65 kDa) sowie das „house keeping“ Protein  $\beta$ -Aktin (MG = 42 kDa). Visualisierung der Proteinbanden nach Applikation spezifischer, an alkalische Phosphatase gekoppelter Sekundärantikörper unter Verwendung von BCIP als Substrat.

### 4.2.3 Monocyte chemoattractant protein-1

Im Rahmen der mit „monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1) inkubierten Kardiomyozyten aus drei Präparationen konnte eine graduelle Reduktion des SERCA / NCX Expressionsverhältnisses mit steigender MCP-1 Konzentration ermittelt werden. Dabei nahm der SERCA / NXC Quotient bei MCP-1 in der Konzentration von 1  $\mu$ g/ml gegenüber den Werten der unstimulierten Kontrollgruppe signifikant um  $35,9\% \pm 14,2\%$  ab (Abb. 15). MCP-1 in hoher Konzentration bewirkte somit eine Verminderung der SERCA Expression bei in den funktionellen Studien (Abb. 9) registrierter Zunahme der kontraktile Funktion kultivierter Kardiomyozyten.

## Ergebnisse



**Abbildung 15: Einfluss von MCP-1 auf die SERCA / NCX Expression in Kardiomyozyten normotensiver Ratten: Western blot Analyse**

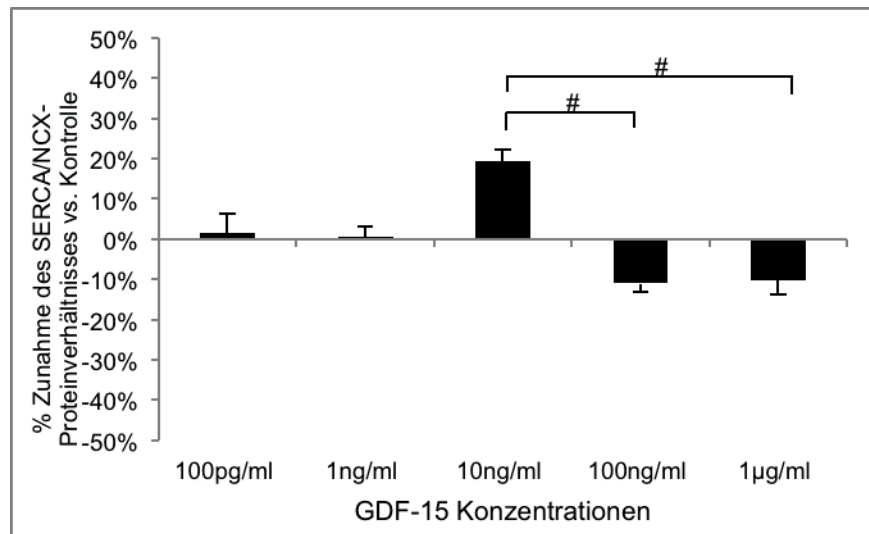
Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher normotensiver Wistar-Hannover-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit „monocyte chemoattractant protein“ (MCP-1) in logarithmisch steigender Konzentration. Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Western blot Analyse für die Expression der Kalzium-ATPase (SERCA) und des Natrium-Kalzium Antiporters (NCX) mittels antigenspezifischer Primärantikörper und Sekundärantikörper-gekoppelter alkalischer Phosphatase-Reaktion. Dargestellt ist das Expressionsverhältnis SERCA / NCX, wobei  $\beta$ -Aktin jeweils als „house keeping“ Protein diente; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei Präparationen mittels einfaktorieller ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

### 4.2.4 Growth and differentiation factor-15

Die basierend auf der Inkubation von Kardiomyozyten normotensiver Ratten aus sieben Präparationen mit „growth and differentiation factor-15“ (GDF-15) ermittelten Daten in der Western blot Analyse zeigten für die Expression von SERCA und NCX auf Proteinebene ein ähnlich heterogenes Bild wie bei den Inkubationsstudien mit IL-8 (Abb. 13 und 16). So führte GDF-15 in niedrigen Konzentrationen von 100 pg/ml und 1 ng/ml zu keinerlei Veränderung des SERCA / NCX Quotienten, während 10 ng/ml GDF-15 eine tendentielle, statistisch jedoch nicht signifikante Erhöhung des Expressionsverhältnisses gegenüber den Kontrollwerten von  $19,5\% \pm 2,9\%$  zur Folge hatte. Im Gegensatz dazu errechneten sich für die beiden höchsten GDF-15 Konzentrationen (100 ng/ml resp. 1  $\mu$ g/ml) Reduktionen des SERCA / NCX Expressionsverhältnisses gegenüber den Kontrollwerten der unstimulierten Zellen um - ebenfalls nicht signifikante -  $11,0\% \pm 2,0\%$  resp.  $10,2\% \pm 3,3\%$  (Abb. 16). Diese marginale Hemmung erwies sich - im diekten Vergleich zu dem leicht stimulatorischen Effekt von GDF-15 in

## Ergebnisse

der Konzentration von 10 ng/ml - als statistisch signifikant, wengleich biologisch möglicherweise bedeutungslos.



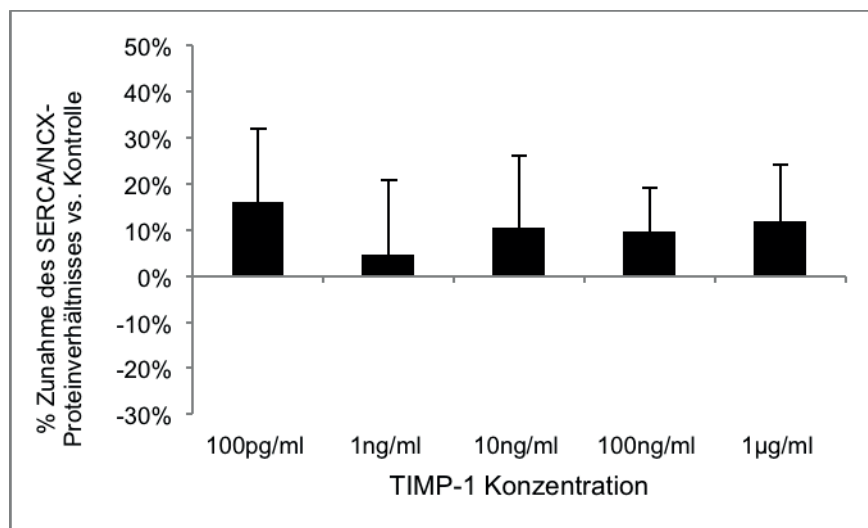
**Abbildung 16: Einfluss von GDF-15 auf die SERCA / NCX Expression in Kardiomyozyten normotensiver Ratten: Western blot Analyse**

Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher normotensiver Wistar-Hannover-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit „growth and differentiation factor-15“ (GDF-15) in logarithmisch steigender Konzentration. Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Western blot Analysen für die Expression der Kalzium-ATPase (SERCA) und des Natrium-Kalzium Antiporters (NCX) mittels antigenspezifischer Primärantikörper und Sekundärantikörper-gekoppelter alkalischer Phosphatase-Reaktion. Dargestellt ist das Expressionsverhältnis SERCA / NCX, wobei  $\beta$ -Aktin jeweils als „house keeping“ Protein diente; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus sieben Präparationen mittels einfaktorieller ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

### 4.2.5 Tissue inhibitor of metalloproteinases-1

Die mit „tissue inhibitor of metalloproteinases-1“ (TIMP-1) stimulierten Kardiomyozyten normotensiver Hannover-Wistar-Ratten aus sechs Präparationen zeigten über den gesamten TIMP-1 Konzentrationsbereich eine tendentielle, in keinem Fall jedoch signifikante Erhöhung des SERCA / NCX Expressionsverhältnisses aufgrund der hohen „standard errors of the mean“ der errechneten Mittelwerte (Abb 17).

## Ergebnisse



**Abbildung 17: Einfluss von TIMP-1 auf die SERCA / NCX Expression in Kardiomyozyten normotensiver Ratten: Western blot Analyse**

Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher normotensiver Wistar-Hannover-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit „tissue inhibitor of metalloproteinases-1“ (TIMP-1) in logarithmisch steigender Konzentration. Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Western blot Analysen für die Expression der Kalzium-ATPase (SERCA) und des Natrium-Kalzium Antiporters (NCX) mittels antigenspezifischer Primärantikörper und Sekundärantikörper-gekoppelter alkalischer Phosphatase-Reaktion. Dargestellt ist das Expressionsverhältnis SERCA / NCX, wobei  $\beta$ -Aktin jeweils als „house keeping“ Protein diente; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus sechs Präparationen mittels einfaktorieller ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

### 4.3 Wirkung einzelner Zytokine auf isolierte Kardiomyozyten hypertensiver Ratten

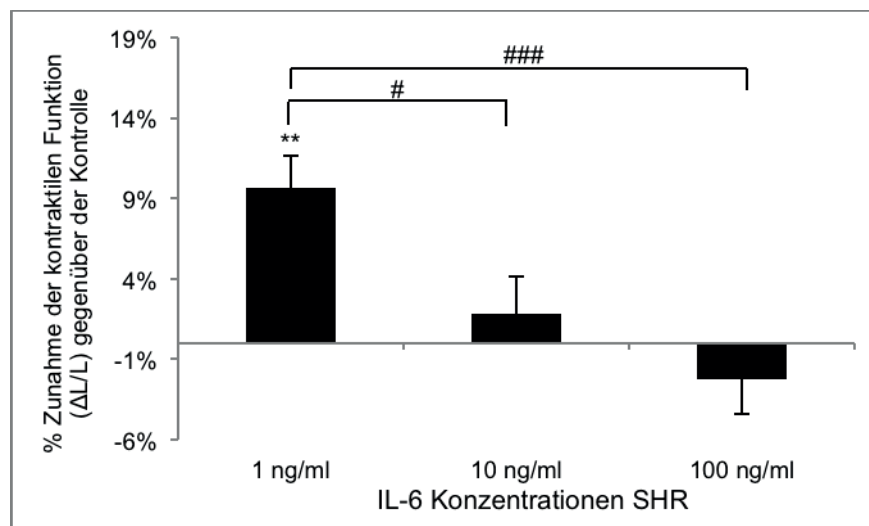
In Analogie zu den unter 4.1 dargestellten Untersuchungen zur Zytokin- bzw. TIMP-1 induzierten Modulation der kontraktilen Funktion isolierter Kardiomyozyten normotensiver Hannover-Wistar-Ratten wurden Versuche mit identischem Design (die elektrische Stimulation, Auswertung und statistische Analyse betreffend) an isolierten Kardiomyozyten spontan hypertensiver Ratten (SHR) durchgeführt. Die 1963 von Okamoto und Mitarbeitern an der Universität in Kyoto (Japan) durch Verpaarung zweier spontan hypertensiver Wistar-Ratten entwickelte Rattenlinie bildet im Alter von 7 - 15 Wochen eine spontane, manifeste Hypertension aus. Der Ursprung dieses Bluthochdrucks ist polygenetisch, wobei mindestens drei Gene beteiligt sind (Janvier Labs). Aufbauend auf die zuvor durchgeführten und ausgewerteten Versuche erfolgten die Zellstimulationen für die fünf genannten Mediatoren (IL-6, IL-8, MCP-1, GDF-15, TIMP-1) bei den Kardiomyozyten der SHR-Ratten allerdings lediglich im Bereich der mittleren Konzentrationen von 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml. Dieser Bereich

## Ergebnisse

wurde gewählt, da hier alle Zytokine ihre deutlichsten Effekte auf die kontraktile Funktion isolierter Kardiomyozyten zeigten.

### 4.3.1 Interleukin-6

Im Unterschied zu den aus dem Myokard normotensiver Hannover-Wistar-Ratten isolierten Kardiomyozyten, reagierten die Kardiomyozyten aus dem Myokard der SHR-Ratten schon auf die Stimulation mit IL-6 in der niedrigen Konzentration von 1 ng/ml mit einer signifikanten Steigerung ihrer kontraktilen Funktion um  $9,6\% \pm 2,0\%$  gegenüber der Kontrolle. Andererseits erwies sich IL-6 in Konzentrationen von 10 bzw. 100 ng/ml als unwirksam, eine Modulation der kontraktilen Funktion zu induzieren (Abb. 18). Dabei basierte die Auswertung der Daten auf der Analyse von 60 - 93 Kardiomyozyten aus sechs bis zehn Zellkulturschalen (fünf Präparationen).



**Abbildung 18: Einfluss von Interleukin-6 auf die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten hypertensiver Ratten in der Primärkultur**

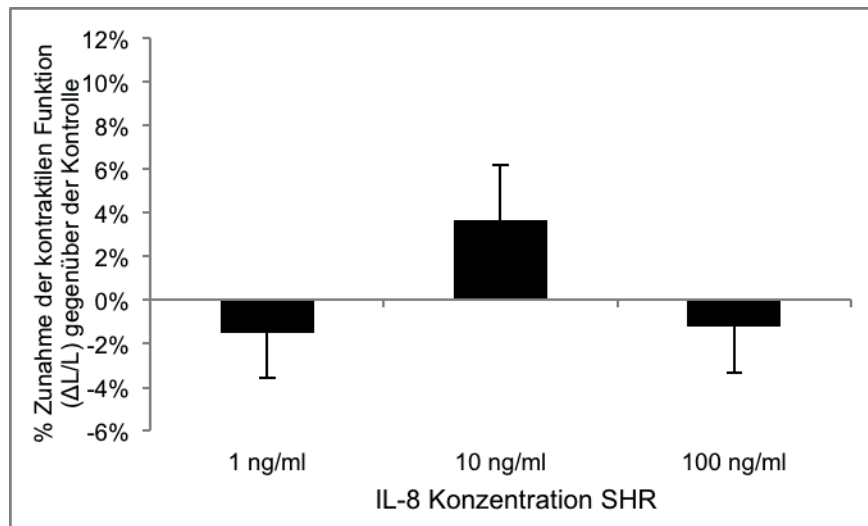
Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher hypertensiver SHR-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit Interleukin-6 (IL-6) in logarithmisch steigender Konzentration. Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Dargestellt ist der Einfluss von IL-6 auf die kontraktile Funktion ( $\Delta L/L$ -%) nach Elektrostimulation (0,5 Hz, 20 V, 5 ms) von jeweils 60 - 93 Kardiomyozyten; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0  $\Delta L/L$ -% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM mittels einfaktorieller ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

### 4.3.2 Interleukin-8

Das CXC-Chemokin Interleukin-8 (IL-8) wurde konzentrationsabhängig an 64 - 100 Kardiomyozyten aus sieben bis zehn Zellkulturschalen (fünf Präparationen) hypertensiver SHR-Ratten auf seine modifizierende Wirkung bezüglich der kontraktilen Funkti-

## Ergebnisse

on hin getestet. Wie aus den marginalen  $\Delta L/L$ -% Werten ersichtlich, ergaben sich in Gegenwart von IL-8 (1 - 100 ng/ml) keine zur Kontrolle statistisch signifikant unterschiedlichen Messwerte (Abb. 19), ganz im Gegensatz zu den für Kardiomyozyten normotensiver Hannover-Wistar-Ratten erhobenen Befunden (Abb. 8).



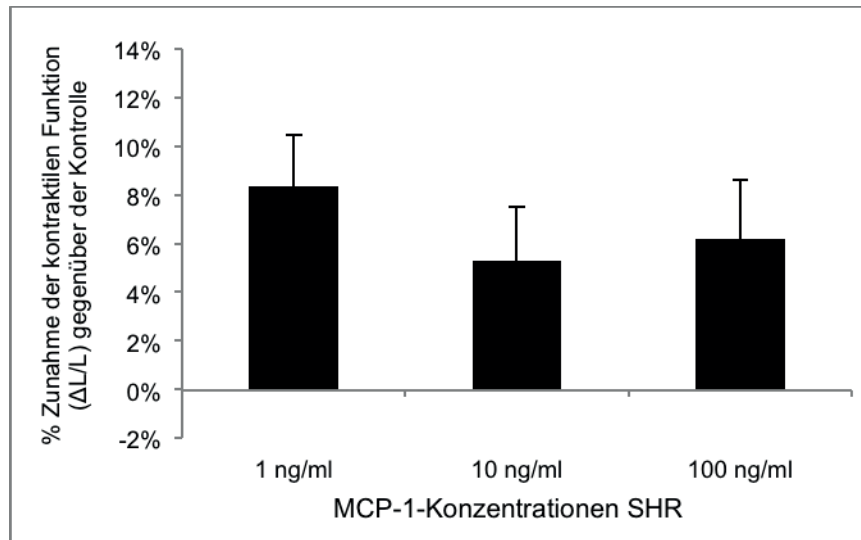
**Abbildung 19: Einfluss von Interleukin-8 auf die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten hypertensiver Ratten in der Primärkultur**

Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher hypertensiver SHR-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit Interleukin-8 (IL-8) in logarithmisch steigender Konzentration. Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Dargestellt ist der Einfluss von IL-8 auf die kontraktile Funktion ( $\Delta L/L$ -%) nach Elektrostimulation (0,5 Hz, 20 V, 5 ms) von jeweils 64 - 100 Kardiomyozyten; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0  $\Delta L/L$ -% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM mittels einfaktorieller ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

### 4.3.3 Monocyte chemoattractant protein-1

Das an 80 Kardiomyozyten hypertensiver SHR-Ratten aus acht Zellkulturschalen (vier Präparationen) auf seine biologische Wirkung hinsichtlich einer Modulation der kontraktiven Funktion getestete „monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1) bedingte im Rahmen des eingesetzten Konzentrationsbereichs (1 - 100 ng/ml) eine tendentielle, statistisch jedoch nicht signifikante Zunahme der zellulären kontraktiven Funktion mit mittleren prozentualen Zuwachsraten von lediglich 5 - 8% (Abb. 20). Damit ist ein dem für Kardiomyozyten normotensiver Tiere durchaus vergleichbares Reaktionsmuster erzielt worden (Abb. 9).

## Ergebnisse



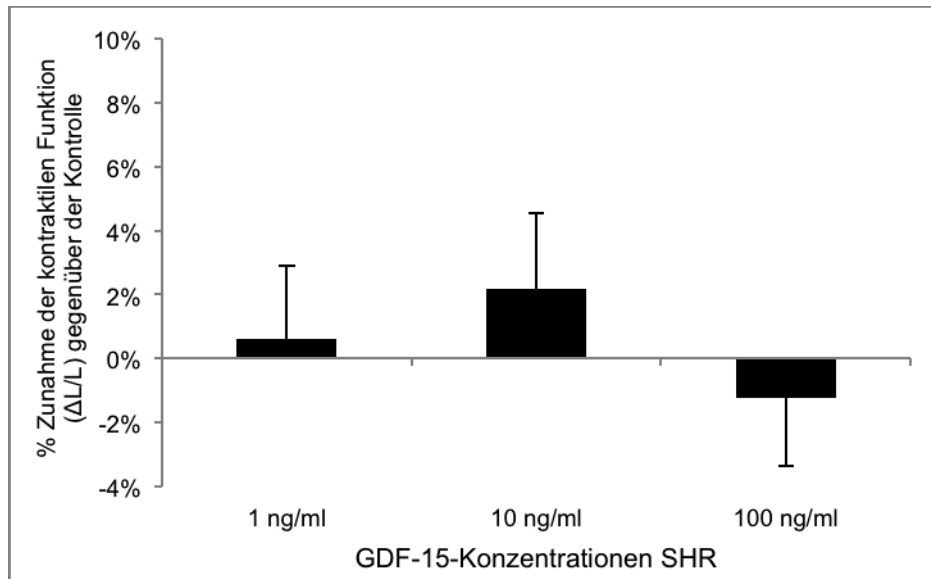
**Abbildung 20: Einfluss von MCP-1 auf die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten hypertensiver Ratten in der Primärkultur**

Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher hypertensiver SHR-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit „monocyte attractant protein-1“ (MCP-1) in logarithmisch steigender Konzentration. Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Dargestellt ist der Einfluss von MCP-1 auf die kontraktile Funktion ( $\Delta L/L$ -%) nach Elektrostimulation (0,5 Hz, 20 V, 5 ms) von jeweils 80 Kardiomyozyten; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0  $\Delta L/L$ -% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM mittels einfaktorieller ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

### 4.3.4 Growth and differentiation factor-15

Das für den der TGF-Familie zugehörige „growth and differentiation factor-15“ (GDF-15) an jeweils 80 Kardiomyozyten hypertensiver SHR-Ratten aus acht Zellkulturschalen (vier Präparationen) erarbeitete Reaktionsprofil gleicht dem für IL-8 dargestellten. (Abb. 21). Zusammen kann festgestellt werden, dass GDF-15 sowohl auf den funktionellen Parameter ( $\Delta L/L$ -%) von Kardiomyozyten normotensiver als auch hypertensiver Ratten keinen modulierenden Einfluss hatte (siehe Abb. 10).

## Ergebnisse



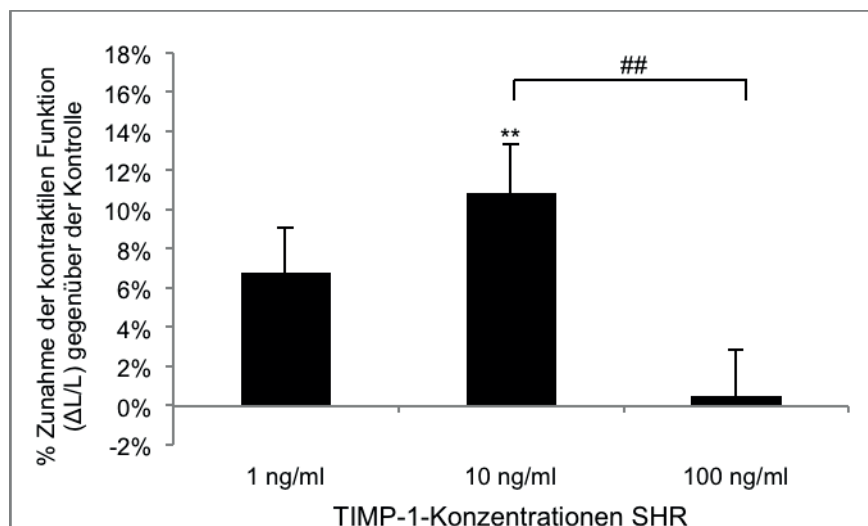
**Abbildung 21: Einfluss von GDF-15 auf die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten hypertensiver Ratten in der Primärkultur**

Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher hypertensiver SHR-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit „growth and differentiation factor-15“ (GDF-15) in logarithmisch steigender Konzentration. Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Dargestellt ist der Einfluss von GDF-15 auf die kontraktile Funktion ( $\Delta L/L$ -%) nach Elektrostimulation (0,5 Hz, 20 V, 5 ms) von jeweils 80 Kardiomyozyten; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0  $\Delta L/L$ -% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM mittels einfaktorieller ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

### 4.3.5 Tissue inhibitor of metalloproteinases-1

Der als „tissue inhibitor 1“ spezifischer Metalloproteinasen (TIMP-1) bezeichnete endogene Hemmstoff dieser Enzyme zeigte eine tendentielle bzw. hoch signifikante Zunahme der zellulären kontraktilen Funktion bei Konzentrationen von 1 ng/ml resp. 10 ng/ml (Abb. 22), vergleichbar zu den für Kardiomyozyten normotensiver Ratten erhobenen Daten (Abb. 11). So steigerte die Inkubation mit 10 ng/ml TIMP-1 die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten hypertensiver Ratten um  $10,8\% \pm 2,5\%$  gegenüber derjenigen der unstimulierten Kontrollgruppe. In der zehnfach höheren Konzentration von 100 ng/ml TIMP-1 jedoch konnte kein Effekt mehr auf die systolische Kontraktionskraft nachgewiesen werden, wodurch sich eine schon für die Kardiomyozyten normotensiver Ratten angedeutete glockenförmige Dosis-Wirkungs-Kurve näherungsweise widerspiegelt (Abb. 22). Die Datenanalyse erfolgte für jeweils 80 Kardiomyozyten aus acht Zellkulturschalen (vier Präparationen).

## Ergebnisse



**Abbildung 22: Einfluss von TIMP-1 auf die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten hypertensiver Ratten in der Primärkultur**

Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher hypertensiver SHR-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit „tissue inhibitor of metalloproteinases-1“ (TIMP-1) in logarithmisch steigender Konzentration. Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Dargestellt ist der Einfluss von TIMP-1 auf die kontraktile Funktion ( $\Delta L/L$ -%) nach Elektrostimulation (0,5 Hz, 20 V, 5 ms) von jeweils 80 Kardiomyozyten der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0  $\Delta L/L$ -% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM mittels einfaktorieller ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

### 4.4 Einfluss von Zytokinkombinationen auf die Funktion isolierter Kardiomyozyten normotensiver Ratten

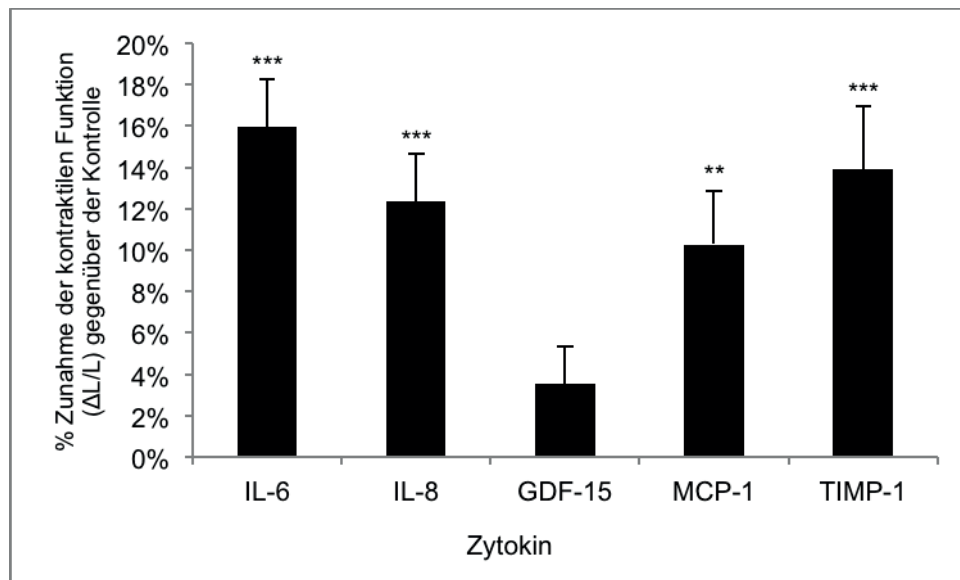
Basierend auf den experimentellen Untersuchungen hinsichtlich der Bedeutung jeweils eines der genannten Zytokine (IL-6, IL-8, MCP-1, GDF-15) und TIMP-1 für die kontraktile Funktion kultivierter Kardiomyozyten ( $\Delta L/L$ -%) sowie die Expression von SERCA und NCX auf Proteinebene von normotensiven Ratten (Kap. 4.1 und Kap. 4.2) ergab sich die Fragestellung, inwieweit die Kombination zweier Zytokine zu synergistischen Effekten für die beiden Messparameter führen könnte.

#### 4.4.1 Kontraktile Funktion bei „hohen Zytokinkonzentrationen“

Dabei wurden zunächst die in Tab. 3 des Methodenteils dargestellten Kombinationen aus jeweils zwei Zytokinen in denjenigen Konzentrationen gewählt, welche bei Einzelapplikation (Kap. 4.1) in geringster Konzentration zu signifikanten Veränderungen von  $\Delta L/L$ -% geführt haben. Sie werden im Folgenden als „hohe Konzentrationen“ bezeichnet: IL-6 (10 ng/ml), IL-8 (1 ng/ml), MCP-1 (100 ng/ml), TIMP-1 (1 ng/ml). GDF-15 wurde trotz statistisch nicht nachgewiesener Effektivität in einer Konzentration von 1 ng/ml eingesetzt. Neben den „Null“-Kontrollen (unbehandelte Kardiomyozyten) wur-

## Ergebnisse

den als zusätzliche Kontrollversuche Elektrostimulationen zur Erfassung der kontraktiven Funktion in Gegenwart von jeweils nur einem der in Kombination eingesetzten Zytokine durchgeführt. Dabei ließen sich die bereits in Kap. 4.1 beschriebenen Ergebnisse überzeugend reproduzieren (Abb. 23), wobei 57 - 173 Kardiomyozyten aus 8 - 23 Zellkulturschalen (neun Präparationen) analysiert wurden. So induzierten IL-6 resp. IL-8 im direkten Vergleich mit der Kontrolle ohne Zytokinstimulation, hoch signifikante Steigerungen der kontraktiven Funktion ( $\Delta L/L$ -%) um  $16\% \pm 2,3\%$  resp.  $12,0\% \pm 2,3\%$ , MCP-1 bzw. TIMP-1 um  $10,3\% \pm 2,6\%$  bzw.  $13,0\% \pm 3,1\%$ . Wie schon in Kap. 4.1 gezeigt, erwies sich GDF (1 ng/ml) als ineffektiv, die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten zu modulieren.



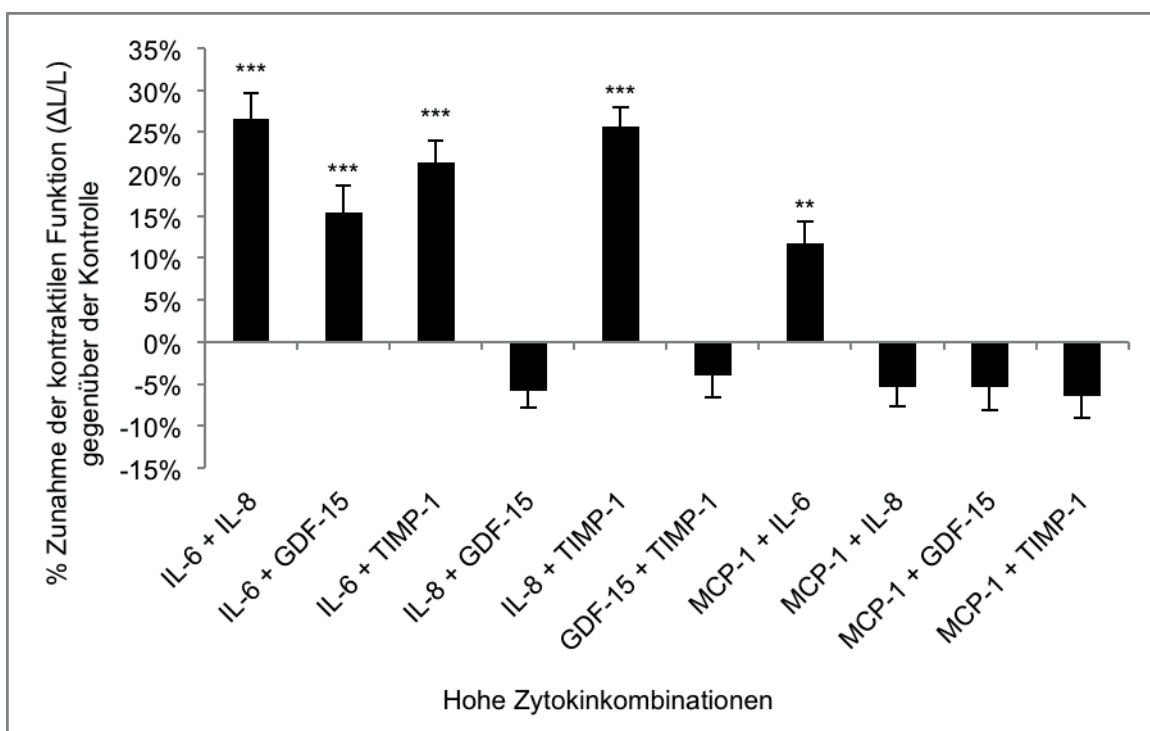
**Abbildung 23: Einfluss einzelner Zytokine auf die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten normotensiver Ratten in der Primärkultur**

Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher normotensiver Wistar-Hannover-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit Interleukin 6 (IL-6; 10 ng/ml), Interleukin-8 (IL-8; 1 ng/ml), „growth and differentiation factor-15“ (GDF-15; 1 ng/ml), „monocyte attractant protein-1“ (MCP-1; 100 ng/ml) und „tissue inhibitor of metalloproteinases-1“ (TIMP-1; 1 ng/ml). Als Kontrolle dienen unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Dargestellt ist der Einfluss der Zytokine auf die kontraktile Funktion ( $\Delta L/L$ -%) nach Elektrostimulation (0,5 Hz, 20 V, 5 ms) von jeweils 57 - 173 Kardiomyozyten; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0  $\Delta L/L$ -% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM mittels einfaktorieller ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

Speziell die kombinierte Koapplikationen mit IL-6 (10 ng/ml) verursachte eine hochsignifikante zusätzliche Steigerung der kontraktiven Funktion kultivierter Kardiomyozyten gegenüber der Kontrolle (Abb. 24). IL-6 in Kombination mit IL-8 zeigte eine signifi-

## Ergebnisse

kante superponierte Aktivierung der Kardiomyozyten gegenüber IL-8 alleine ( $12,35\% \pm 2,28\%$ ) mit  $\Delta L/L$ -% Werten von  $26,2\% \pm 3,1\%$  (Abb. 25). Dieser Effekt zeigte sich ebenfalls gegenüber IL-6, in der statistischen Auswertung jedoch war er nicht signifikant ausgeprägt. Die Kombination aus IL-6 mit GDF-15 zeigte ein ähnliches Profil wie die eben beschriebene Kombination; auch hier waren signifikante superponierte Steigerungen der kontraktilen Funktion gegenüber GDF-15 alleine ( $3,54\% \pm 1,80\%$ ) messbar mit  $\Delta L/L$ -% Werten von  $15,4\% \pm 3,2\%$  (Abb. 25), die gegenüber IL-6 alleine nicht erhöht waren. Die Kombination aus IL-6 mit TIMP-1 zeigte ebenfalls eine superponierte Zunahme der kontraktilen Funktion der gemittelten Werte ( $\Delta L/L$ -%) von  $21,4\% \pm 2,7\%$  (Abb. 24 + Abb. 25), welche jedoch weder signifikant gegenüber IL-6 noch TIMP-1 alleine waren. Lediglich die Kombination aus IL-6 mit MCP-1 erwies sich als ineffektiv gegenüber IL-6 oder MCP-1 alleine, wie sich aus dem gemittelten Wert ( $\Delta L/L$ -%) von  $11,8\% \pm 2,6\%$  zeigte (Abb. 24 + Abb. 25).

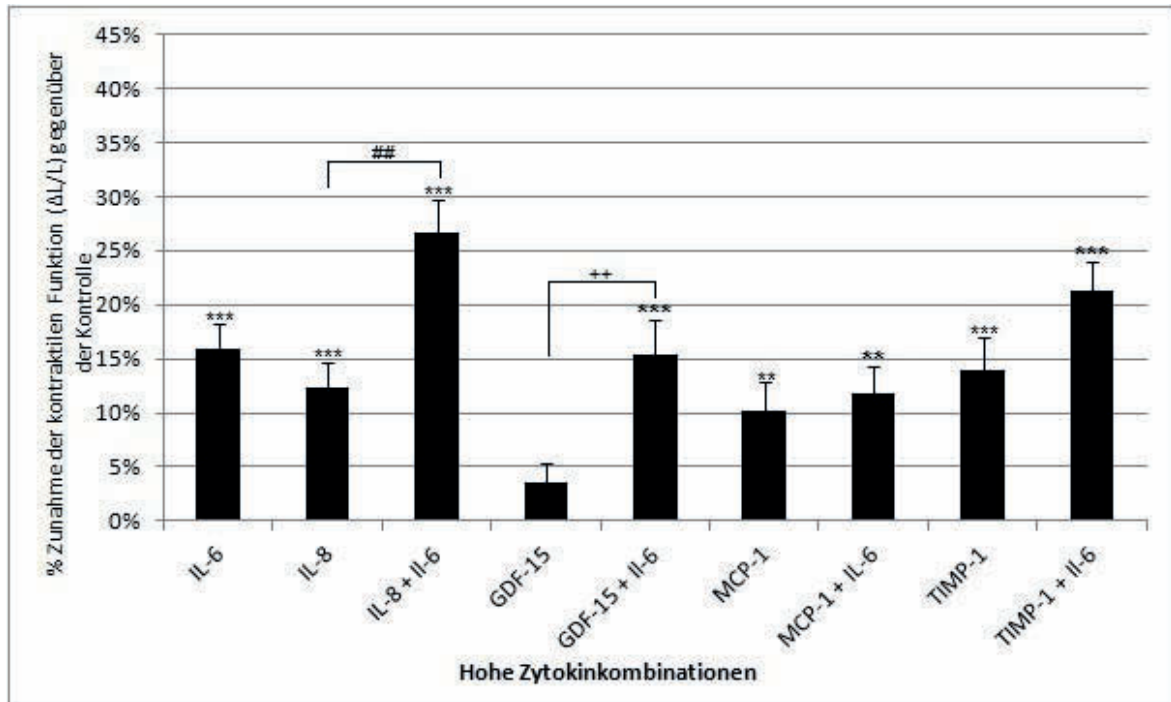


**Abbildung 24: Einfluss verschiedener Zytokine in Zweierkombinationen auf die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten normotensiver Ratten in der Primärkultur**

Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher normotensiver Wistar-Hannover-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit Zweierkombinationen aus Interleukin 6 (IL-6; 10 ng/ml), Interleukin-8 (IL-8; 1 ng/ml), „growth and differentiation factor-15“ (GDF-15; 1 ng/ml), „monocyte attractant protein-1“ (MCP-1; 100 ng/ml) und „tissue inhibitor of metalloproteinases-1“ (TIMP-1; 1 ng/ml). Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Dargestellt ist der Einfluss der Zytokine auf die kontraktile Funktion ( $\Delta L/L$ -%) nach Elektrostimulation (0,5 Hz, 20 V, 5 ms) von jeweils 57 - 173 Kardiomyozyten; der

## Ergebnisse

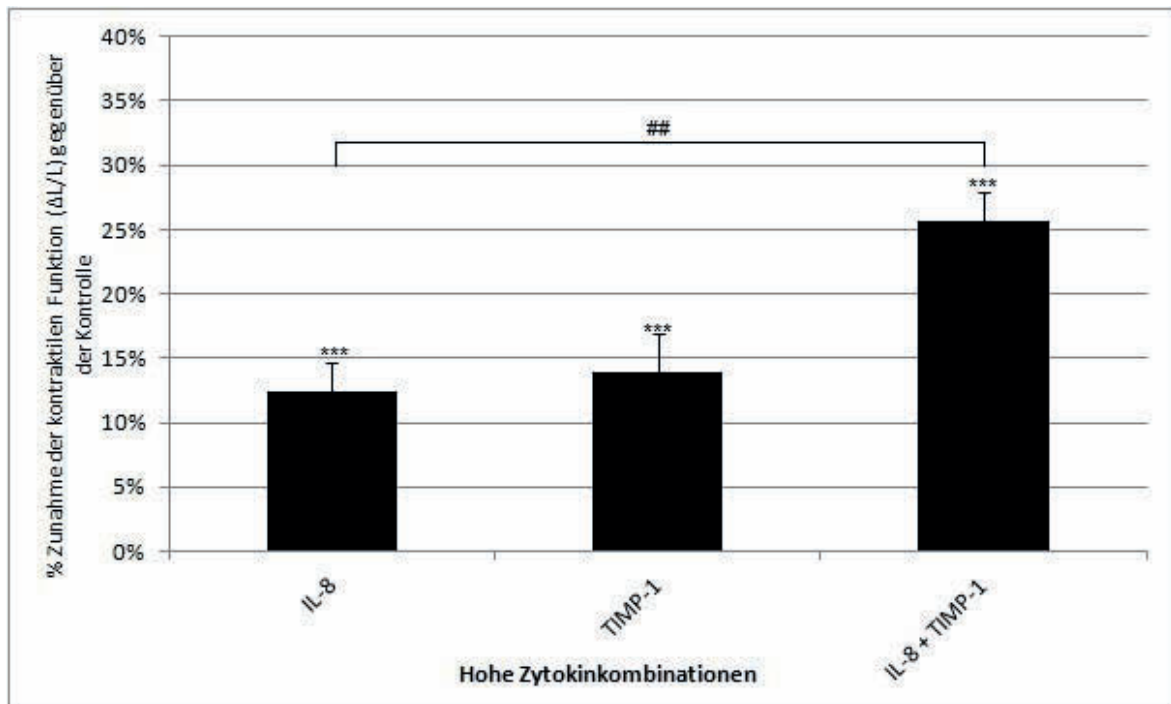
gemittelte Kontrollwert wurde zu 0  $\Delta$ L/L-% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM mittels einfaktorieller ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).



**Abbildung 25: Einfluss verschiedener Zytokine in Zweierkombinationen auf die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten normotensiver Ratten in der Primärkultur und ihre Signifikanzen untereinander**

Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher normotensiver Wistar-Hannover-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit Zweierkombinationen aus Interleukin 6 (IL-6; 10 ng/ml), Interleukin-8 (IL-8; 1 ng/ml), „growth and differentiation factor-15“ (GDF-15; 1 ng/ml), „monocyte attractant protein-1“ (MCP-1; 100 ng/ml) und „tissue inhibitor of metalloproteinases-1“ (TIMP-1; 1 ng/ml). Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Dargestellt ist der Einfluss der Zytokine auf die kontraktile Funktion ( $\Delta$ L/L-%) nach Elektrostimulation (0,5 Hz, 20 V, 5 ms) von jeweils 57 - 173 Kardiomyozyten; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0  $\Delta$ L/L-% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM mittels einfaktorieller ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

## Ergebnisse



**Abbildung 26: Einfluss von IL-8 und TIMP-1 in Kombination auf die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten normotensiver Ratten in der Primärkultur**

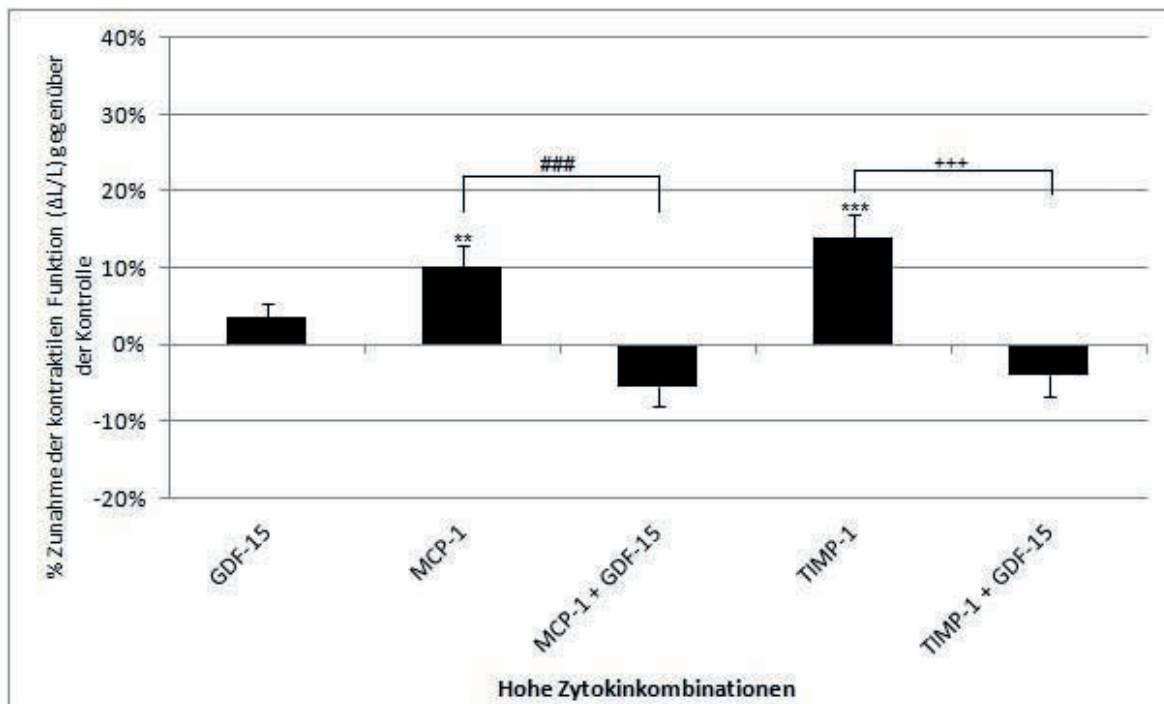
Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher normotensiver Wistar-Hannover-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit Zweierkombinationen aus Interleukin-8 (IL-8; 1 ng/ml) und „tissue inhibitor of metallo-proteinases-1“ (TIMP-1; 1 ng/ml). Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Dargestellt ist der Einfluss der Zytokine auf die kontraktile Funktion ( $\Delta L/L$ -%) nach Elektrostimulation (0,5 Hz, 20 V, 5 ms) von jeweils 71 - 173 Kardiomyozyten; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0  $\Delta L/L$ -% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM mittels einfaktorieller ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

In allen anderen getesteten Kombinationen zeigte lediglich IL-8 in Kombination mit TIMP-1 eine signifikante superponierte Steigerung der kontraktilen Funktion, sowohl gegenüber IL-8 als auch gegenüber TIMP-1 alleine mit einem gemittelten  $\Delta L/L$ -% Wert von  $25,7\% \pm 2,3\%$  (Abb. 25). Sowohl die Kostimulationen von IL-8 mit GDF-15 als auch mit MCP-1 jedoch hatten andererseits eine vollständige Reversion der durch IL-8 alleine hervorgerufenen Effekte zur Folge (Abb. 24). Bei intrinsisch kontraktionssteigernder Wirkung sowohl von MCP-1 als auch TIMP-1 (Abb. 23) ergab sich für die Kostimulation mit beiden Zytokinen ein sicherlich unerwartetes Ergebnis mit sogar marginaler Reduktion der  $\Delta L/L$ -% Werte auf  $-6,3\% \pm 2,6\%$ , im direkten Vergleich zur „Null“-Kontrolle (Abb. 24).

## Ergebnisse

Die Kombination aus GDF-15 mit MCP-1 oder TIMP-1 hob die positive Steigerung der kontraktile Funktion der beiden einzelnen Mediatoren vollständig auf mit  $\Delta L/L$ -% Werten von  $-5,4\% \pm 2,7\%$  resp.  $-4,0\% \pm 2,7\%$  (Abb. 27).

Es wurden 57 - 173 Kardiomyozyten aus 8 - 23 Zellkulturschalen (neun Präparationen) analysiert.



**Abbildung 27: Einfluss von GDF-15, MCP-1 und TIMP-1 Zweierkombinationen auf die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten normotensiver Ratten in der Primärkultur**

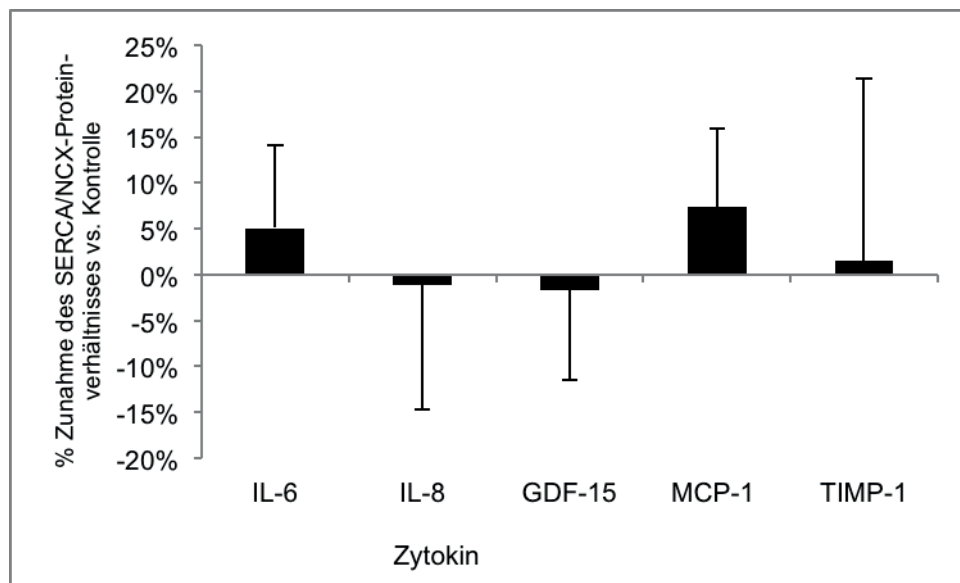
Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher normotensiver Wistar-Hannover-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit Zweierkombinationen aus „growth and differentiation factor-15“ (GDF-15; 1 ng/ml), „monocyte attractant protein-1“ (MCP-1; 100 ng/ml) und „tissue inhibitor of metallo-proteinases-1“ (TIMP-1; 1 ng/ml). Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Dargestellt ist der Einfluss der Zytokine auf die kontraktile Funktion ( $\Delta L/L$ -%) nach Elektrostimulation (0,5 Hz, 20 V, 5 ms) von jeweils 73 - 173 Kardiomyozyten; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0  $\Delta L/L$ -% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM mittels einfaktorier ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

### 4.4.2 SERCA / NCX Expressionsverhältnis bei „hohen Zytokinkonzentrationen“

Vergleichbar zu den Kontraktionsstudien an kultivierten Kardiomyozyten normotensiver Ratten wurden auch für die Bestimmung des SERCA / NCX Expressionsverhältnisses auf Proteinebene neben den „Null“-Kontrollen (unbehandelte Kardiomyozyten) Experimente zur Erfassung des SERCA / NCX Verhältnisses in Gegenwart von jeweils einem der in Kombination eingesetzten Zytokine durchgeführt. Während die in

## Ergebnisse

Kap. 4.2 schon beschriebene Unwirksamkeit von IL-8, GDF-15 und TIMP-1 verifiziert werden konnte, ließ sich der tendentiell hemmende Effekt bei Stimulation mit MCP-1 (100 ng/ml) nicht wiederholen. Dem Versuch für IL-6 (10 ng/ml) mit Zunahme des SERCA / NCX Quotienten um ca. 26% aus Kap. 4.2 stand ein Wert von lediglich  $5,0 \pm 9,0\%$  gegenüber, wobei aufgrund des hohen „standard error of the mean“ (SEM) Wertes diese Erhöhung keine statistisch signifikante Aussage ermöglichte.



**Abbildung 28: Einfluss einzelner Zytokine auf das SERCA / NCX Expressionsverhältnis in Kardiomyozyten normotensiver Ratten: Western blot Analyse**

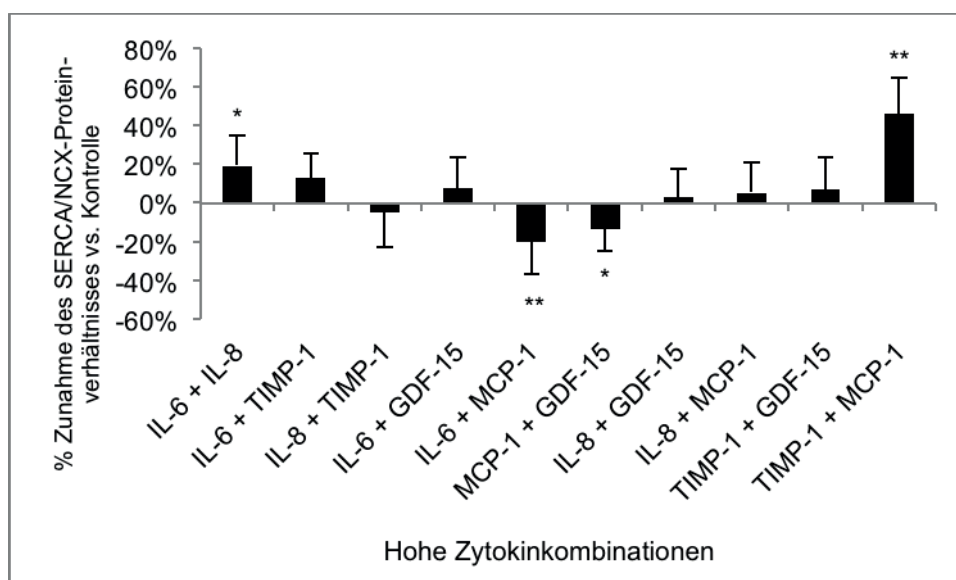
Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher normotensiver Wistar-Hannover-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit Interleukin 6 (IL-6; 10 ng/ml), Interleukin-8 (IL-8; 1 ng/ml), „growth and differentiation factor-15“ (GDF-15; 1 ng/ml), „monocyte attractant protein-1“ (MCP-1; 100 ng/ml) und „tissue inhibitor of metalloproteinases-1“ (TIMP-1; 1 ng/ml). Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Western blot Analysen für die Expression der Kalzium-ATPase (SERCA) und des Natrium-Kalzium Antiporters (NCX) mittels antigenspezifischer Primärantikörper und Sekundärantikörpergekoppelter alkalischer Phosphatase-Reaktion. Dargestellt ist das Expressionsverhältnis SERCA / NCX, wobei  $\beta$ -Aktin jeweils als „house keeping“ Protein diente; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus neun Präparationen mittels einfaktorieller ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

Kostimulation der Kardiomyozyten mit IL-6 (10 ng/ml) und IL-8 (1 ng/ml) führte zu einer signifikanten Steigerung des SERCA / NCX Verhältnisses auf  $19,5\% \pm 15,3\%$  gegenüber der „Null“-Kontrolle (Abb. 29) sowie einer tendentiellen Erhöhung im Vergleich zu den Werten nach alleiniger IL-6 Applikation ( $5,05\% \pm 9,01\%$ ) (Abb. 28), während TIMP-1 und GDF-15 offensichtlich nicht in der Lage waren, die IL-6 medierte

## Ergebnisse

Antwort zu modifizieren. Überraschenderweise hatte die Koapplikation mit MCP-1 (100 ng/ml) eine signifikante Reduktion der SERCA / NCX Expression auf sogar  $-20,4\% \pm 16,9\%$  im Vergleich zu den „Null“-Kontrollwerten zur Folge (Abb. 29).

Die Ineffektivität von IL-8 alleine, die Syntheserate eines der beiden Proteine zu beeinflussen (Abb. 13 und 28) konnte weder durch MCP-1, GDF-15 oder TIMP-1 modifiziert werden (Abb. 29). Während MCP-1 als einzelnes Zytokin entweder zu einer nicht-signifikanten aber tendentiellen Reduktion (Abb. 15) oder aber zu einer Erhöhung (Abb. 28) der SERCA / NCX Expression führte, bedingte die Koapplikation von GDF-15 bzw. TIMP-1 eine signifikante Erniedrigung auf  $-13,9\% \pm 11,2\%$  der „Null“-Kontrollwerte bzw. eine hochsignifikante Erhöhung um  $46,1\% \pm 18,4\%$  (Abb. 29). Je Konstellation wurden 8 - 23 Zellkulturschalen aus neun Präparationen analysiert.



**Abbildung 29: Einfluss verschiedener Zytokine in Zweierkombinationen auf das SERCA / NCX Expressionsverhältnis in Kardiomyozyten normotensiver Ratten: Western blot Analyse**

Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher normotensiver Wistar-Hannover-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit Zweierkombinationen aus Interleukin 6 (IL-6; 10 ng/ml), Interleukin-8 (IL-8; 1 ng/ml), „growth and differentiation factor-15“ (GDF-15; 1 ng/ml), „monocyte attractant protein-1“ (MCP-1; 100 ng/ml) und „tissue inhibitor of metalloproteinases-1“ (TIMP-1; 1 ng/ml). Als Kontrolle dienen unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Western blot Analyse für die Expression der Kalzium-ATPase (SERCA) und des Natrium-Kalzium Antiporters (NCX) mittels antigenspezifischer Primärantikörper und Sekundärantikörper-gekoppelter alkalischer Phosphatase-Reaktion. Dargestellt ist das Expressionsverhältnis SERCA / NCX, wobei  $\beta$ -Aktin jeweils als „house keeping“ Protein diente; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus neun Präparationen mittels einfaktorierter ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

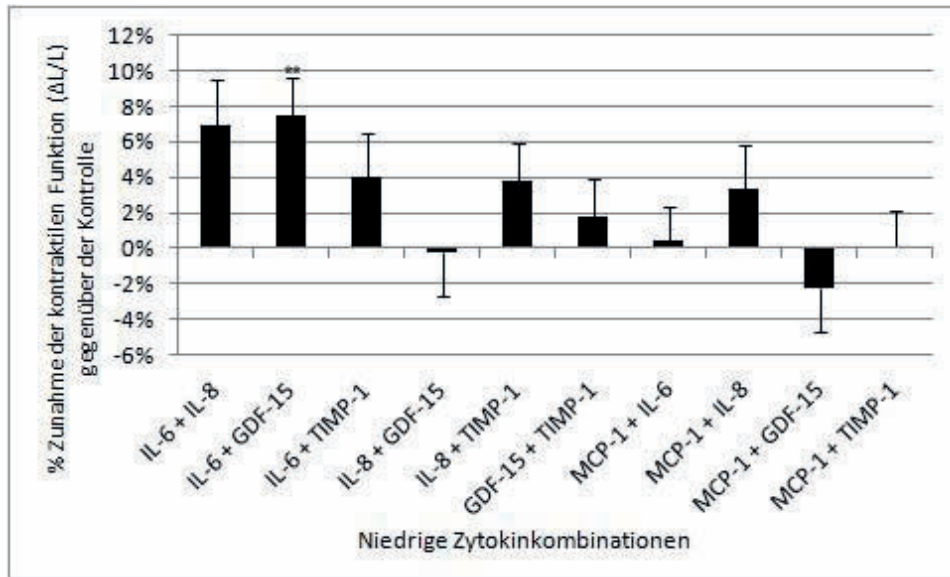
## Ergebnisse

### 4.4.3 Kontraktile Funktion bei „niedrigen Zytokinkonzentrationen“

Der Versuchsaufbau entsprach dem der vorangegangenen Serie von Experimenten (Kap. 4.4.1), wobei jedes der jeweils beiden Zytokine in einer zehnfach geringeren Konzentration als in Kap. 4.4.1 eingesetzt wurde: IL-6 (1 ng/ml), IL-8 (100 pg/ml), MCP-1 (10 ng/ml), GDF-15 (100 pg/ml) und TIMP-1 (100 pg/ml). Dabei sollte der potentiell synergistische Effekt der verschiedenen Zytokine mit IL-6 im Vordergrund stehen.

Da keine parallelen Messungen zur Erfassung der kontraktile Funktion in Gegenwart von nur jeweils einem der in Kombination eingesetzten Zytokine durchgeführt wurden, (wie für die Experimente in Kap. 4.4.1 geschehen) ließen sich - neben dem Vergleich mit den „Null“-Kontrollen (unbehandelte Kardiomyozyten) - lediglich indirekte Aussagen zur einer modulierenden Wirkung des jeweils zweiten auf den Effekt des ersten Zytokins durch Vergleich mit den in Kap. 4.1 repräsentierten Daten vornehmen. Aus Abb. 31 geht deutlich hervor, dass - im Vergleich mit den „Null“-Kontrollen - lediglich die Kombination aus IL-6 und GDF-15 zu einer statistisch signifikanten Steigerung der kontraktile Funktion um  $7,5\% \pm 2,1\%$  führte. Unter Bezugnahme auf die in Kap. 4.1 gezeigten Daten für die Dosis-abhängige Stimulation der kontraktile Funktion mit nur einem Zytokin in der oben jeweils angegebenen Konzentration, lagen folgende mittlere  $\Delta L/L\%$  Werte für IL-6, IL-8, MCP-1, GDF-15 und TIMP-1 vor:  $2,8\% \pm 1,4\%$ ,  $4,6\% \pm 2,4\%$ ,  $8,1\% \pm 2,2\%$ ,  $-0,2\% \pm -1,5\%$  und  $5,0\% \pm 1,7\%$  (siehe Abb. 7 - 11) vor. Während sich mittlere  $\Delta L/L\%$  Werte nach Kostimulation von IL-6 mit IL-8 ( $7,0\% \pm 2,5\%$ ) bzw. GDF-15 ( $7,5\% \pm 2,1\%$ ) in etwa additiv zu denen bei Einzelstimulation für beide Zytokine erwiesen, bewirkte die Kostimulation von IL-6 mit MCP-1 bzw. TIMP-1 eher niedrigere  $\Delta L/L\%$  Werte als nach Einzelapplikation für beide Zytokine (Abb. 30). Dies traf zudem auch für die Zytokinpaare IL-8 und MCP-1 bzw. IL-8 und TIMP-1 zu. Im direkten Vergleich der erhaltenen Ergebnisse bei Zytokinkombinationen „hoher“ mit denen „niedriger“ Konzentrationen ergaben sich tendentiell ähnliche Effektmuster, vor allem die Koapplikation eines zweiten Zytokins mit IL-6 betreffend. Lediglich die Kombinationen von GDF-15 und TIMP-1 sowie IL-8 und MCP-1 führten bei „niedrigen Konzentrationen“ zu gegensätzlichen Effekten zu denen bei „hohen Konzentrationen“, wobei sich der Unterschied nicht als statistisch signifikant darstellen ließ. Insgesamt wurden 72 - 144 Zellen aus 9 - 18 Zellkulturschalen (fünf Präparationen) charakterisiert.

## Ergebnisse



**Abbildung 30: Einfluss verschiedener Zytokine in Zweierkombinationen auf die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten normotensiver Ratten in der Primärkultur**

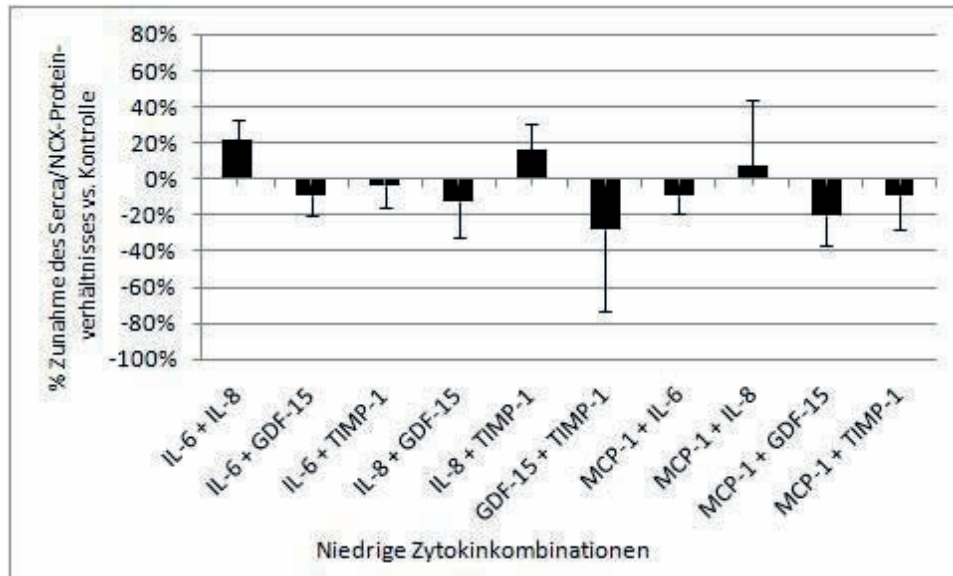
Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher normotensiver Wistar-Hannover-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit Zweierkombinationen aus Interleukin 6 (IL-6; 1 ng/ml), Interleukin-8 (IL-8; 100 pg/ml), „growth and differentiation factor-15“ (GDF-15; 100 pg/ml), „monocyte attractant protein-1“ (MCP-1; 10 ng/ml) und „tissue inhibitor of metalloproteinases-1“ (TIMP-1; 100 pg/ml). Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Dargestellt ist der Einfluss der Zytokine auf die kontraktile Funktion ( $\Delta L/L$ -%) nach Elektrostimulation (0,5 Hz, 20 V, 5 ms) von jeweils 72 - 144 Kardiomyozyten; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0  $\Delta L/L$ -% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM mittels einfaktorier ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

#### 4.4.4 SERCA / NCX Expressionsverhältnis bei „niedrigen Zytokinkonzentrationen“

Die Analyse des SERCA / NCX Expressionsverhältnisses auf Proteinebene nach Stimulation kultivierter Kardiomyozyten bei Kombinationen aus jeweils zwei Zytokinen in „niedrigen Konzentrationen“ lieferte vergleichbare Ergebnisse zu den Daten bei „hohen Konzentrationen“, wobei sich Unterschiede zu den „Null“-Kontrollen als nicht signifikant erwiesen (Abb. 31). Wie schon für den funktionellen Kontraktionstest beschrieben, wurden keine parallelen Messungen zur Erfassung der Proteinexpression in Gegenwart von nur jeweils einem der in Kombination eingesetzten Zytokine durchgeführt. Es konnten lediglich indirekte Aussagen zur einer modulierenden Wirkung des jeweils zweiten auf den Effekt des ersten Zytokins durch Vergleich mit den in Kap. 4.2 repräsentierten Daten durchgeführt werden (Abb. 12 - 17). Je Konstellation wurden 9 - 18 Zellkulturschalen aus fünf Präparationen analysiert. IL-6 (1 ng/ml) als wichtigstes Zytokin war *per se* nicht in der Lage, den SERCA / NCX Quotienten signifikant zu verändern (Abb. 12);

## Ergebnisse

die Koapplikation keines der vier anderen Zytokine hatte darauf einen signifikanten Einfluss (Abb. 31). Dies war auch für alle weiteren Zytokinkombinationen in den „niedrigen Konzentrationen“ der Fall.



**Abbildung 31: Einfluss verschiedener Zytokine in Zweierkombinationen auf das SERCA / NCX Expressionsverhältnis in Kardiomyozyten normotensiver Ratten: Western blot Analyse**

Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher normotensiver Wistar-Hannover-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit Zweierkombinationen aus Interleukin 6 (IL-6; 1 ng/ml), Interleukin-8 (IL-8; 100 pg/ml), „growth and differentiation factor-15“ (GDF-15; 100 pg/ml), „monocyte attractant protein-1“ (MCP-1; 10 ng/ml) und „tissue inhibitor of metalloproteinases-1“ (TIMP-1; 100 pg/ml). Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Western blot Analysen für die Expression der Kalzium-ATPase (SERCA) und des Natrium-Kalzium Antiporters (NCX) mittels antigenspezifischer Primärantikörper und Sekundärantikörper-gekoppelter alkalischer Phosphatase-Reaktion. Dargestellt ist das Expressionsverhältnis SERCA / NCX, wobei  $\beta$ -Aktin jeweils als „house keeping“ Protein diente; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus fünf Präparationen mittels einfaktorier ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

### **4.5 Blockade der Zytokinwirkung auf die kontraktile Funktion isolierter Kardiomyozyten durch Bindung an zytokinspezifische Antikörper**

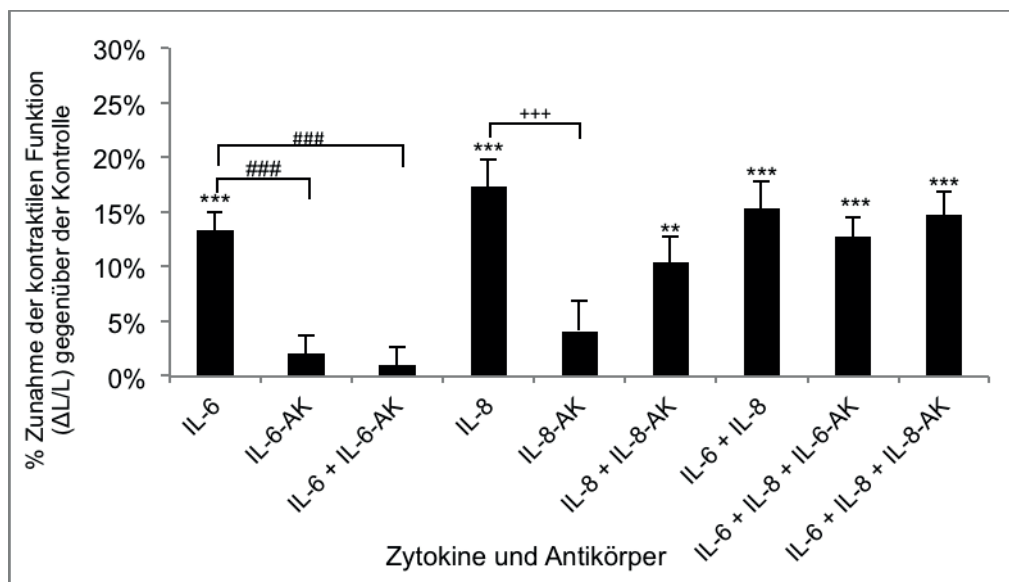
Die Analyse der Experimente aus Kap. 4.4.1 hat ergeben, dass Kombinationen aus IL-6 und IL-8, IL-6 und TIMP-1, IL-6 und GDF-15, IL-6 und MCP-1 sowie IL-8 und TIMP-1 zu einer superponiert gesteigerten kontraktile Funktion der Kardiomyozyten normotensiver Ratten im direkten Vergleich zur Wirkung des jeweils einzel applizierten Zytokins geführt haben. Andererseits bewirkten die Kostimulationen von IL-8 mit GDF-15, GDF-15 mit TIMP-1, MCP-1 mit IL-8 und GDF-15 mit TIMP-1 eine offensichtlich überlagerte Hemmung der kontraktile Funktion.

Daher war es von Interesse herauszufinden, welches der beiden im Rahmen einer Zweierkombination (Kap. 4.4.1) eingesetzten Zytokine maßgeblich an der superponierten Änderung der Kontraktionssteigerung beteiligt war. Dafür wurden spezifische Antikörper gegen IL-6, IL-8 und MCP-1 zu deren Neutralisation in den in Tab. 4 des Methodenteils angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Anhand der Ergebnisse der Studien aus Kap. 4.1 und Kap. 4.4.1 wurden für die Zytokine die „hohen Zytokinkonzentrationen“ gewählt: IL-6 (10 ng/ml), IL-8 (1 ng/ml), MCP-1 (100 ng/ml) und TIMP-1 (1 ng/ml). GDF-15 wurde in einer Konzentration von 1 ng/ml eingesetzt. In den einzelnen vier Versuchsserien wurde jeweils IL-6 (10 ng/ml) mit einem der vier anderen Zytokine kombiniert. Um direkte Vergleiche durchführen zu können, wurden Zellkulturschalen mit kultivierten Kardiomyozyten parallel erneut mit lediglich einem Zytokin stimuliert. Dabei konnten die Ergebnisse aus Kap. 4.1 weitestgehend reproduziert werden und es zeigten sich gegenüber den „Null“-Kontrollen jeweils hochsignifikante Steigerungen der kontraktile Funktion nach Inkubation mit IL-6, IL-8 und MCP-1 (Abb. 32 und Abb. 33). GDF-15 zeigte wie erwartet keinen Effekt (Abb. 34). Überraschenderweise bewirkte TIMP-1 in dieser Versuchsserie ebenfalls keine Zunahme der kontraktile Funktion (Abb. 35). Um Autoeffekte der Immunglobuline ausschließen zu können, wurden Zellkulturschalen lediglich mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert.

Einzelstimulationen mit IL-6 (10 ng/ml) führten zu einer markanten Steigerung der kontraktile Funktion kultivierter Kardiomyozyten auf  $13,3\% \pm 1,7\%$ , welche in Gegenwart des IL-6 spezifischen Antikörpers auf  $1,0\% \pm 1,8\%$  hochsignifikant reduziert wurde (Abb. 32). Das Zytokin IL-8 (1 ng/ml) erhöhte die kontraktile Funktion der isolierten Kardiomyozyten gegenüber der „Null“-Kontrolle ebenfalls hochsignifikant auf  $17,3\% \pm 2,6\%$ , wobei die IL-8 induzierte Wirkung lediglich tendentiell durch den eingesetzten IL-8 spezifischen Antikörper auf  $10,4\% \pm 2,4\%$  vermindert werden konnte

## Ergebnisse

(Abb. 32). Die Inkubation der Kardiomyozyten lediglich mit den für IL-6 resp. IL-8 spezifischen Antikörpern verursachte keine Veränderung der zellulären Kontraktion (Abb. 32). Die Kombinationsapplikation von IL-6 und IL-8 erwies sich zwar gegenüber den „Null“-Kontrollwerten als signifikant auf  $15,4\% \pm 2,5\%$  gesteigert, nicht jedoch im direkten Vergleich mit den beiden Einzelstimulationen. Interessant in diesem Kontext war, dass der Einsatz des IL-6 Antikörpers lediglich eine marginale, tendentielle Reduktion der  $\Delta L/L$ -% Werte gegenüber der Kombinationsapplikation verursachte und der IL-8 Antikörper sich als nahezu unwirksam erwies. Insgesamt erfolgte eine Analyse von 40 - 144 Kardiomyozyten aus 5 - 18 Zellkulturschalen (neun Präparationen).



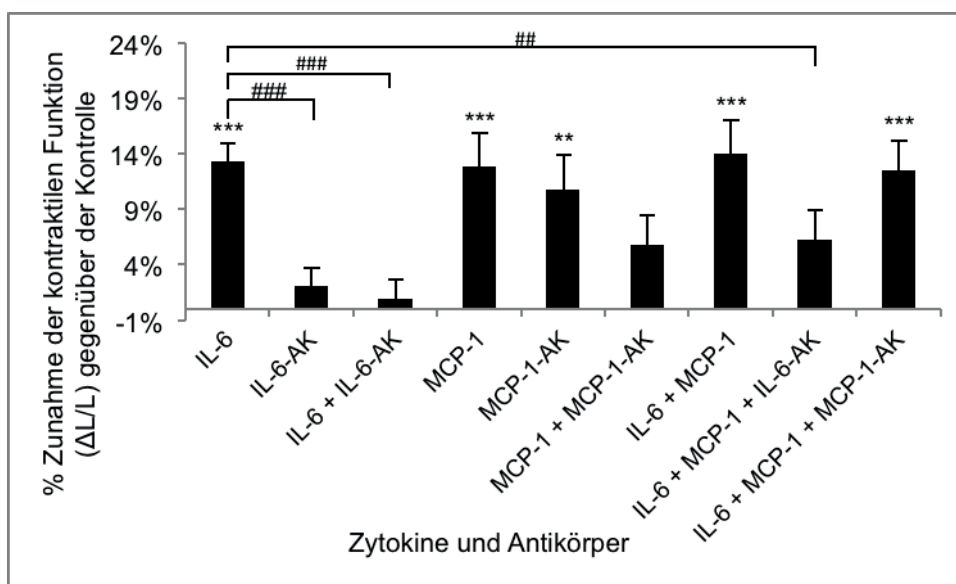
**Abbildung 32: Einfluss der Zytokine IL-6 und IL-8 alleine und in Zweierkombination auf die kontraktile Funktion kultivierter Kardiomyozyten in Gegenwart spezifischer IL-6 und/oder IL-8 Antikörper**

Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher normotensiver Wistar-Hannover-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit Interleukin 6 (IL-6; 10 ng/ml) bzw. Interleukin 8 (IL-8; 1 ng/ml) alleine sowie als Zweierkombination in Ab- bzw. Anwesenheit spezifischer Antikörper (AK; IL-6 AK 1,5  $\mu\text{g/ml}$ , IL-8 AK 3  $\mu\text{g/ml}$ ) gegen eines der beiden (oder beide) Zytokine. Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Dargestellt ist der Einfluss der Zytokine auf die kontraktile Funktion ( $\Delta L/L$ -%) nach Elektrostimulation (0,5 Hz, 20 V, 5 ms) von jeweils 40 - 144 Kardiomyozyten; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0  $\Delta L/L$ -% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM mittels einfaktorieller ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

In vergleichbarer Weise durchgeführte Experimente mit IL-6 (10 ng/ml) resp. MCP-1 (100 ng/ml) bedingten wiederum eine ausgeprägte Zunahme der kontraktile Funktion

## Ergebnisse

auf  $13,3\% \pm 1,7\%$  für IL-6 resp.  $12,8\% \pm 3,0\%$  für MCP-1 gegenüber den „Null“-Kontrollen. In Anwesenheit des MCP-1 Antikörpers ließ sich dieser  $\Delta L/L$ -% Wert lediglich tendentiell auf  $5,8\% \pm 2,6\%$  senken, wobei die alleinige Applikation des Antikörpers *per se* sogar eine signifikante Steigerung der kontraktile Funktion kultivierter Kardiomyozyten mit  $\Delta L/L$ -% Werten von  $10,7\% \pm 3,2\%$  bewirkte (Abb. 33). Die Kombinationsapplikation von MCP-1 mit IL-6 führte, wie zu erwarten, zur hochsignifikanten Steigerung der kontraktile Funktion um  $14,0\% \pm 3,0\%$ , die durch den Einsatz des IL-6 spezifischen Antikörpers deutlich, jedoch nicht signifikant auf  $\Delta L/L$ -% Werte von  $6,3\% \pm 2,7\%$  reduziert werden konnte. Der Einsatz des MCP-1 Antikörpers erwies sich als unwirksam, die erhöhte Steigerung der kontraktile Funktion nach Kombinationsstimulation zu hemmen (Abb. 33). Insgesamt wurde eine Charakterisierung von 48 - 75 Kardiomyozyten aus sechs bis neun Zellkulturschalen (drei Präparationen) durchgeführt.

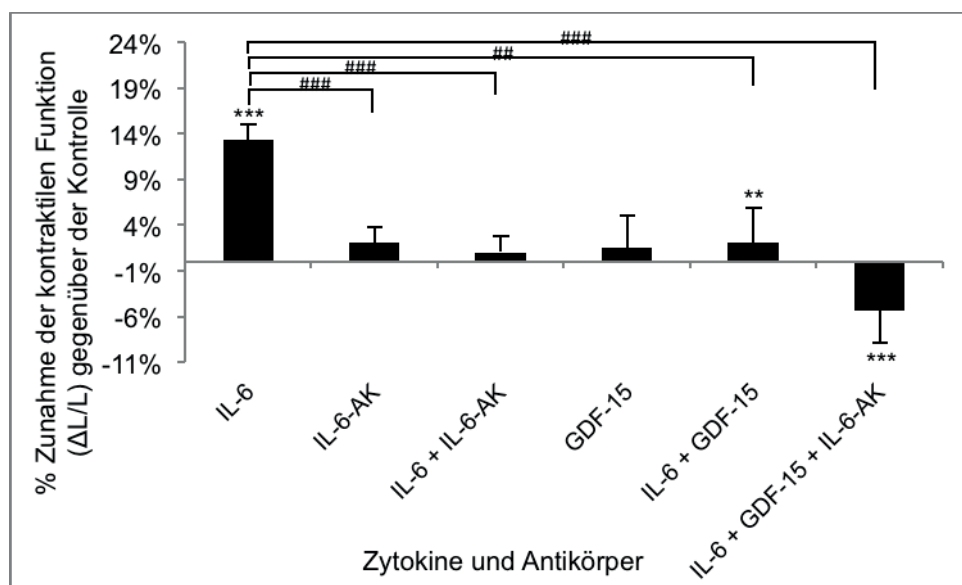


**Abbildung 33: Einfluss der Zytokine IL-6 und MCP-1 alleine und in Zweierkombination auf die kontraktile Funktion kultivierter Kardiomyozyten in Gegenwart spezifischer IL-6 und/oder MCP-1 Antikörper**

Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher normotensiver Wistar-Hannover-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit Interleukin 6 (IL-6; 10 ng/ml) bzw. „monocyte attractant protein-1“ (MCP-1; 100 ng/ml) alleine sowie als Zweierkombination in Ab- bzw. Anwesenheit spezifischer Antikörper (AK; IL-6 AK 1,5 µg/ml, MCP-1 AK 1,5 µg/ml) gegen eines der beiden (oder beide) Zytokine. Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Dargestellt ist der Einfluss der Zytokine auf die kontraktile Funktion ( $\Delta L/L$ -%) nach Elektrostimulation (0,5 Hz, 20 V, 5 ms) von jeweils 48 - 75 Kardiomyozyten; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0  $\Delta L/L$ -% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM mittels einfaktorier ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/###/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/####/+++).

## Ergebnisse

Die ausgeprägt stimulatorische Wirkung von IL-6 (10 ng/ml) mit einer Zunahme der  $\Delta L/L$ -% Werte auf  $13,3\% \pm 1,7\%$  sowie einer maximal supprimierenden Aktivität des IL-6 spezifischen Antikörpers in Gegenwart von IL-6 geht - zum wiederholten Male - auch aus den Studien mit Einzel- bzw. Ko-Applikation von alleine unwirksamem GDF-15 (1 ng/ml) hervor (Abb. 34). Dabei führte die Kombination aus IL-6, GDF-15 und IL-6 Antikörper zu einer hochsignifikanten Reduktion der kontraktile Funktion gegenüber den „Null“-Kontrollwerten sowie den  $\Delta L/L$ -% Werten bedingt durch die Inkubation der Kardiomyozyten mit IL-6 alleine (Abb. 34). Dabei wurden jeweils 48 Zellen aus sechs Zellkulturschalen (drei Präparationen) analysiert.



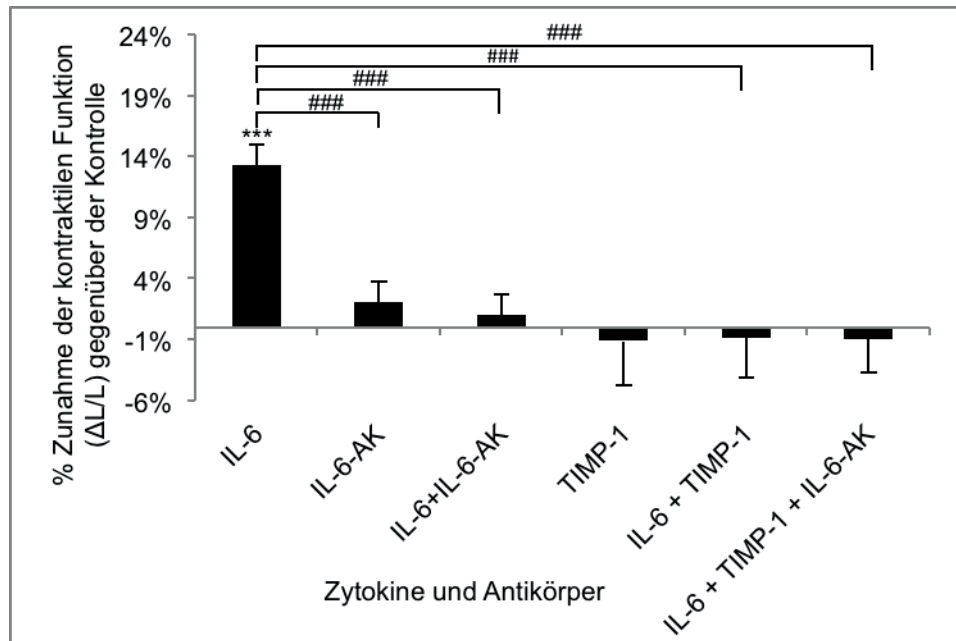
**Abbildung 34: Einfluss der Zytokine IL-6 und GDF-15 alleine und in Zweierkombination auf die kontraktile Funktion kultivierter Kardiomyozyten in Gegenwart spezifischer IL-6 Antikörper**

Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher normotensiver Wistar-Hannover-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit Interleukin 6 (IL-6; 10 ng/ml) bzw. „growth and differentiation factor-15“ (GDF-15; 1 ng/ml) alleine sowie als Zweierkombination in Ab- bzw. Anwesenheit eines IL-6 spezifischen Antikörpers (AK; IL-6 AK 1,5  $\mu$ g/ml). Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Dargestellt ist der Einfluss der Zytokine auf die kontraktile Funktion ( $\Delta L/L$ -%) nach Elektrostimulation (0,5 Hz, 20 V, 5 ms) von jeweils 48 Kardiomyozyten; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0  $\Delta L/L$ -% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM mittels einfaktorier ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

Die Einzel- bzw. Koapplikation von IL-6 (10 ng/ml) mit TIMP-1 (1 ng/ml) betreffend, konnte die in Abb. 11 dargestellte stimulatorische Wirkung von TIMP-1 in der angegebenen Konzentration auf die kontraktile Funktion der kultivierten Kardiomyozyten nicht wiederholt werden (Abb. 35). Eine vergleichbare Aussage musste für die effektlose

## Ergebnisse

Koapplikation von IL-6 und TIMP-1 sowohl in Ab- als auch Anwesenheit des IL-6 spezifischen Antikörpers getroffen werden (Abb. 35). Es wurden 48 Kardiomyozyten aus sechs Zellkulturschalen (drei Präparationen) analysiert.



**Abbildung 35: Einfluss der Zytokine IL-6 und TIMP-1 alleine und in Zweierkombination auf die kontraktile Funktion kultivierter Kardiomyozyten in Gegenwart spezifischer IL-6 Antikörper**

Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher normotensiver Wistar-Hannover-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit Interleukin 6 (IL-6; 10 ng/ml) bzw. „tissue inhibitor of metallo-proteinases-1“ (TIMP-1; 1 ng/ml) alleine sowie als Zweierkombination in Ab- bzw. Anwesenheit eines IL-6 spezifischen Antikörpers (AK; IL-6 AK 1,5 µg/ml). Als Kontrolle dienten unbehandelte Kardiomyozyten (nicht gezeigt). Dargestellt ist der Einfluss der Zytokine auf die kontraktile Funktion ( $\Delta L/L$ -%) nach Elektrostimulation (0,5 Hz, 20 V, 5 ms) von jeweils 48 Kardiomyozyten; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0  $\Delta L/L$ -% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM mittels einfaktorier ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

### 4.6 Wirkung von Zytokinzugaben zu CPC-Kulturen

Die Arbeitshypothese, dass von kardialen CPCs freigesetzte Zytokine parakrin auf das Wachstum benachbarter Kardiomyozyten wirken und die kontraktile Funktion dieser Kardiomyozyten verbessern, sollte erneut getestet werden. Da die durch CPCs freigesetzten Mediatoren aber auch autokrine Effekte auf die CPC selbst ausbilden, sollte dieser Mechanismus durch den Zusatz exemplarischer Zytokine in das Differenzierungsmedium der CPC-Kulturen überprüft werden. Wie in Kap. 3.2 des Methodenteils beschrieben, wurden zwei Zellkulturen aus kardialen Gewebe von normoten-

## Ergebnisse

siven Hannover-Wistar-Ratten und spontan hypertensiven Ratten angelegt. Nach 15-tägiger Kultivierungszeit wurden die Zellkulturen trypsinisiert und in neue Zellkulturschalen überführt. Zellkulturmedium ohne Zusatz von Zytokinen wurde als „conditioned medium“ bezeichnet, während das Medium weiterer Zellkulturschalen IL-6 (10 ng/ml), IL-8 (1 ng/ml) oder MCP-1 (100 ng/ml) enthielt. Bei der alle zwei Tage durchgeführten Waschung der Zellkulturen (siehe Kap. 3.2.4) wurden die Zytokine erneut zugesetzt. Während der Kultivierungsphase zeigten sich weder zwischen den Kulturen aus normo- und hypertensiven Ratten noch zwischen den zytokinfreien und den zytokinbeladenen Kulturen Unterschiede in deren Wachstumsgeschwindigkeit und -charakteristik. Nach zweiwöchiger Kultivierung mit den genannten Zytokinen wurden die Überstände abgenommen und mit steril filtriertem *Aqua bidest* 1:100 verdünnt. Anschließend wurden kultivierte Kardiomyozyten normotensiver Wistar-Ratten mit diesen Überständen in einer finalen Endverdünnung von 1:10000 für 24 Stunden inkubiert (Kap. 3.1.2.4) (Müller 2010), mit nachfolgender Stimulation im elektrischen Feld und Messung der kontraktile Funktion.

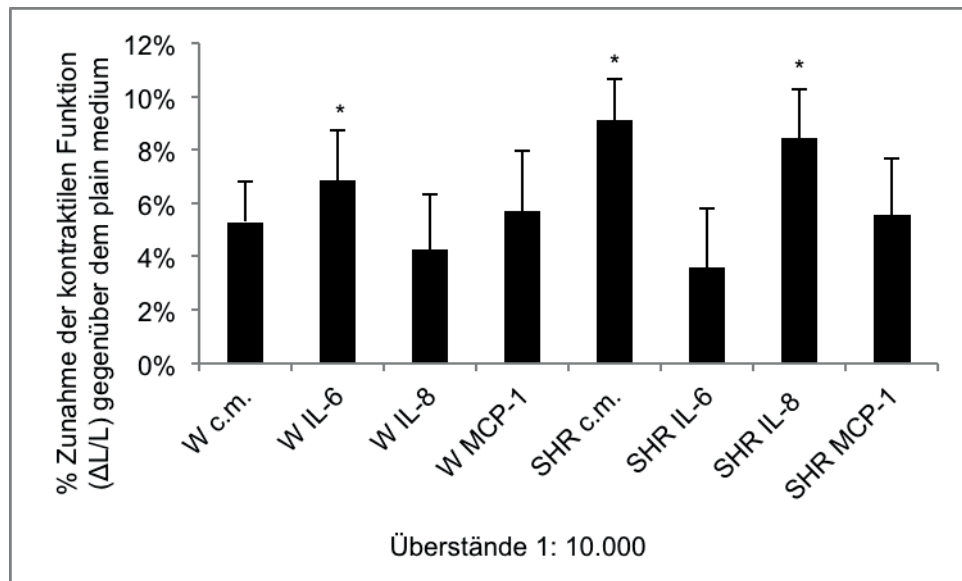
Als Kontrolle diente das „plain medium“. In direktem Vergleich mit der Kontrolle bewirkte schon das „conditioned medium“ ohne Zytokinzusatz eine tendentielle Zunahme der kontraktile Kardiomyozytenfunktion ( $\Delta L/L$ -% Werte) auf  $5,3\% \pm 1,5\%$ . Der Überstand der CPC-Kulturen normotensiver Ratten, welchen IL-6 (1 ng/ml) zugegeben wurde, bewirkte eine signifikante Zunahme der kontraktile Funktion isolierter Kardiomyozyten auf  $6,9\% \pm 1,9\%$  lediglich im Vergleich mit den Kontrollwerten, nicht jedoch mit „conditioned medium“ (Abb. 36). Weder die IL-8 (1 ng/ml) noch MCP-1 (100 ng/ml) Behandlung der CPC-Kulturen führte dazu, dass die kontraktile Funktion der mit CPC-Überstand inkubierten Kardiomyozyten normotensiver Ratten signifikant moduliert wurde (Abb. 36).

Die Überstände der CPC-Kulturen hypertensiver Ratten ohne Zytokinzusatz bzw. mit IL-8 als Zusatz bewirkten zwar jeweils im Vergleich zu den  $\Delta L/L$ -% Werten der Kontrolle mit  $9,1\% \pm 1,6\%$  bzw.  $8,5\% \pm 1,8\%$  eine signifikante Steigerung der kontraktile Funktion der Kardiomyozyten, waren jedoch im direkten Vergleich untereinander nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 36). Weder die Behandlung der CPC-Kulturen mit IL-6 noch MCP-1 führte zu einer Zunahme der kontraktile Funktion isolierter Kardiomyozyten. Es wurden jeweils 48 - 110 Zellen aus 8 - 17 Zellkulturschalen (sechs Präparationen) ausgewertet.

Sowohl die im Differenzierungsmedium der CPCs basal als auch nach Inkubation der CPC-Kulturen mit IL-6, IL-8 oder MCP-1 in den angegebenen Konzentrationen mögli-

## Ergebnisse

cherweise vorhandenen Zytokine (wie postuliert) waren nicht oder nur marginal in der Lage, die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten zu beeinflussen.



**Abbildung 36: Einfluss der CPC-Überstände normotensiver Wistar-Hannover- und hypertensiver SHR-Ratten nach Zytokin-Vorbehandlung auf die kontraktile Funktion kultivierter Kardiomyozyten normotensiver Ratten**

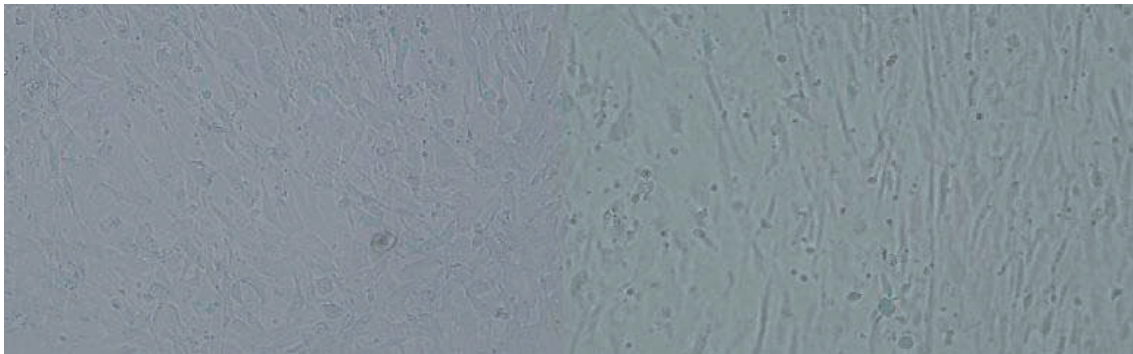
Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher normotensiver Wistar-Hannover-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit final 1:10000 verdünnten Überständen von „cardiac progenitor cell“ (CPC) Kulturen normotensiver (W) und hypertensiver (SHR) Ratten. Beiden CPC-Kulturen wurden für 15 Tage keine Zytokine (c.m. = conditioned medium) bzw. IL-6 (10 ng/ml), IL-8 (1 ng/ml) oder MCP-1 (100 ng/ml) zugesetzt. Als Kontrolle dienten Kardiomyozyten, welche mit „plain medium“ behandelt wurden (nicht gezeigt). Dargestellt ist der Einfluss der CPC-Vorbehandlung auf die kontraktile Funktion ( $\Delta L/L$ -%) nach Elektrostimulation (0,5 Hz, 20 V, 5 ms) von jeweils 48 - 110 normotensiven Kardiomyozyten; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0  $\Delta L/L$ -% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM mittels einfaktorieller ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

### 4.7 Reduktion der IL-6 Expression humaner CPCs durch Einsatz von IL-6 spezifische siRNA

Um die Expression von IL-6 in den Zellkulturen der humanen kardialen Progenitorzellen gezielt herunterregeln zu können, wurde eine small interfering RNA (siRNA) gegen IL-6 eingesetzt. Diese sollte posttranskriptional durch Anlagerung als *antisense* Strang zur entsprechenden mRNA die Expression des Zytokins IL-6 in den CPCs reduzieren. Dazu wurden humane myokardiale Progenitorzellen, wie in Kap. 3.2 beschrieben, gewonnen, kultiviert und entsprechend dem in Kap. 3.2.5 beschriebenen Protokoll für 13 Tage mit IL-6 spezifischer siRNA transfiziert. Zu Beginn galt es herauszufinden, wel-

## Ergebnisse

che der vier siRNAs (Hs\_IL6\_1, Hs-IL6\_2, Hs\_Il6\_5 und Hs-IL6\_6;) die effizienteste Sequenz und welche die optimale Menge an HiPerFect® für eine Reduktion der IL-6 Expression darstellten. Als Kontrolle diente der Überstand einer nicht behandelten CPC-Kultur („conditioned medium“). Im Anschluss wurden Zellen und Überstände isoliert und die Überstände im ELISA auf die tatsächlich exprimierte IL-6-Konzentration untersucht. Als Optimum wurde die siRNA Hs\_IL6\_2 und ein HiPerFect® Volumen von 4,5 µl ermittelt; die Konzentrationen der IL-6 siRNA wurde wie in Tabelle 7 (Kap. 3.2.5) beschrieben auf nach anfänglich zu geringer siRNA-Konzentration auf 25 nmol/l, 50 nmol/l und 75 nmol/l gesteigert. Erst die höheren Konzentrationen der siRNA führten zu einer stärkeren, bei weitem jedoch nicht vollständigen IL-6-Protein-Reduktion im Überstand der humanen CPC-Kulturen (Abb. 39). Wie die Ergebnisse zeigten, reduzierte die siRNA in Abhängigkeit von der HiPerFect®-Menge den IL-6 Gehalt zwar deutlich, jedoch waren auch nach Transfektion mit 75 nmol/l H2\_IL6-2 siRNA und 4,5 µl HiPerFect® immer noch relativ hohe IL-6-Mengen in den Überständen vorhanden (Abb. 39 + 41).



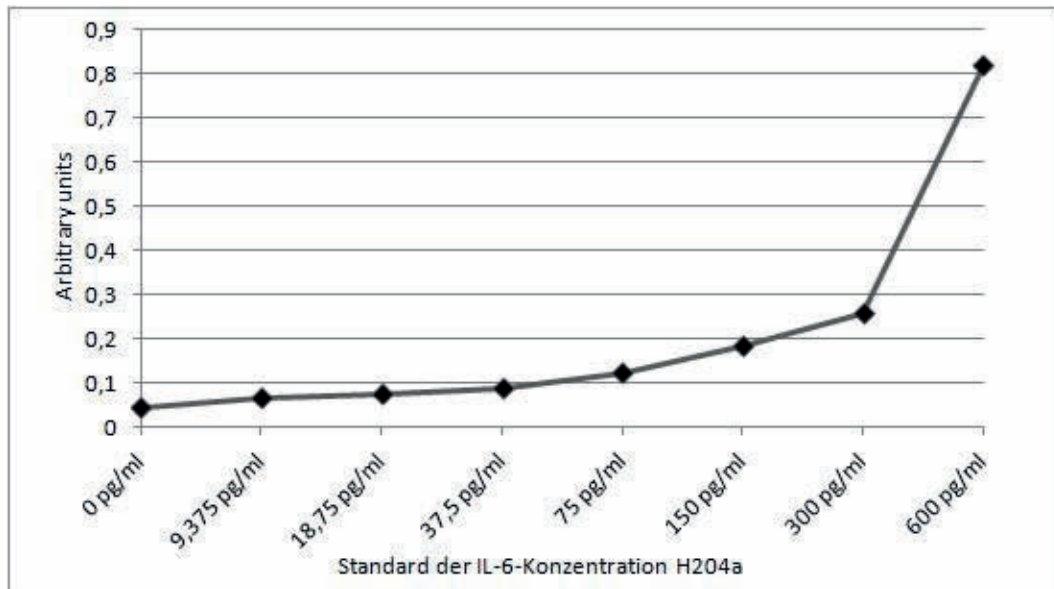
**Abbildung 37: Humane CPC-Kulturen**

Humane CPC-Kulturen (H202 links, H203 rechts) nach Trypsinierung am Tag der Isolation. Es folgten jeweils eine Zugabe von 25 nmol/l siRNA. Nach 14- bzw. 21-tägiger Kultivierung wurden die Zellkulturschalen trypsinisiert und die Zellen in Zellkulturschalen mit „Medium nach Trypsinierung“ überführt. Es folgte eine 14-tägige Transfektion der Zellen mit IL6 spezifischer siRNA.

Dargestellt werden exemplarisch zwei ELISAs für die mit Hs\_IL6\_2 siRNA (25 - 75 nmol/l) transfizierten humanen CPC-Kulturen H206 und H204a (Abb. 38 - 41). Die jeweiligen Kulturüberstände wurden 1:1000 verdünnt, um im ELISA gemessen werden zu können. Das „plain medium“ (reines Zellkulturmedium) der beiden Kulturen wies eine mittlere IL-6 Konzentration von 2,6 ng/ml auf. Durch die Behandlung mit 75 nmol/l siRNA kam es in der CPC-Kultur H206 zu einer Reduktion der IL-6-

## Ergebnisse

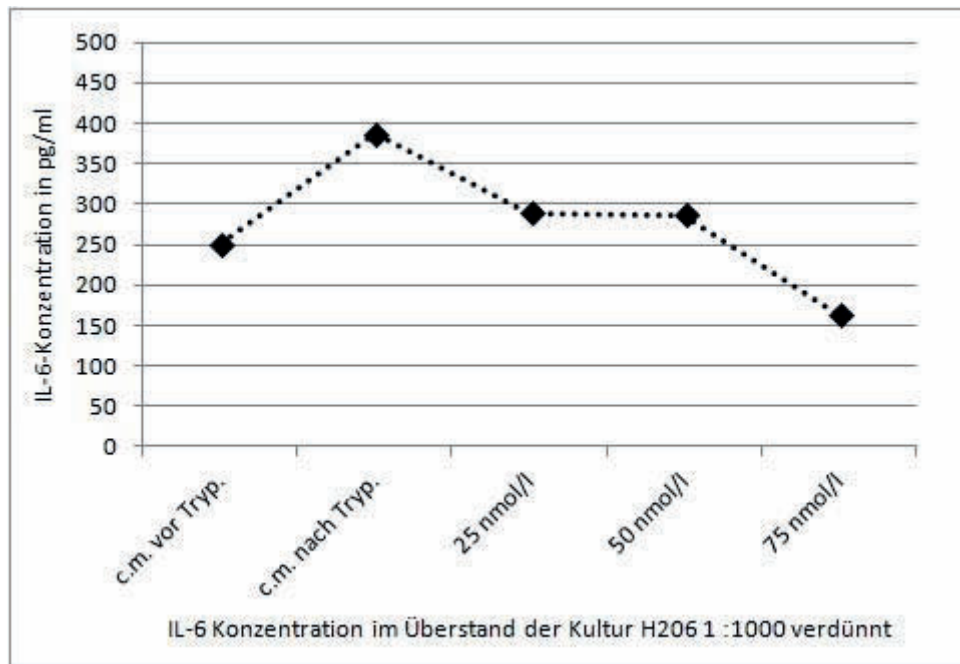
Konzentration im Überstand auf 116,9 ng/ml. Die siRNA war also in der Lage, die IL-6-Konzentration deutlich zu reduzieren. Eine komplette Inhibition der IL-6 Expression war bis Einsatz von 75 nmol/l siRNA leider nicht möglich Laut Herstellerfirma (Fa. Qiagen®) sind noch höhere siRNA-Konzentration toxisch für die Zellen, weswegen auf höhere Konzentrationen verzichtet werden musste.



**Abbildung 38: IL-6-Standardkonzentration H206**

Um im ELISA eine zuverlässige Aussage über die IL-6-Konzentration treffen zu können, ist es möglich eine IL-S-Standardverdünnungsreihe zu erstellen. Dazu wurden schrittweise Konzentrationen von 0 bis 600 pg/ml im Doppelansatz auf jeder ELISA-Platte mitgeführt. Bei 450 und 550 nm wurde dann die Extinktion der Standardproben gemessen und in arbitrary units umgerechnet. So konnte die jeweilige IL-6-Konzentration einer bestimmten Menge an arbitrary units zugeordnet werden und dementsprechend die Konzentration in den Proben (s. Abb. 39) bestimmt werden.

## Ergebnisse

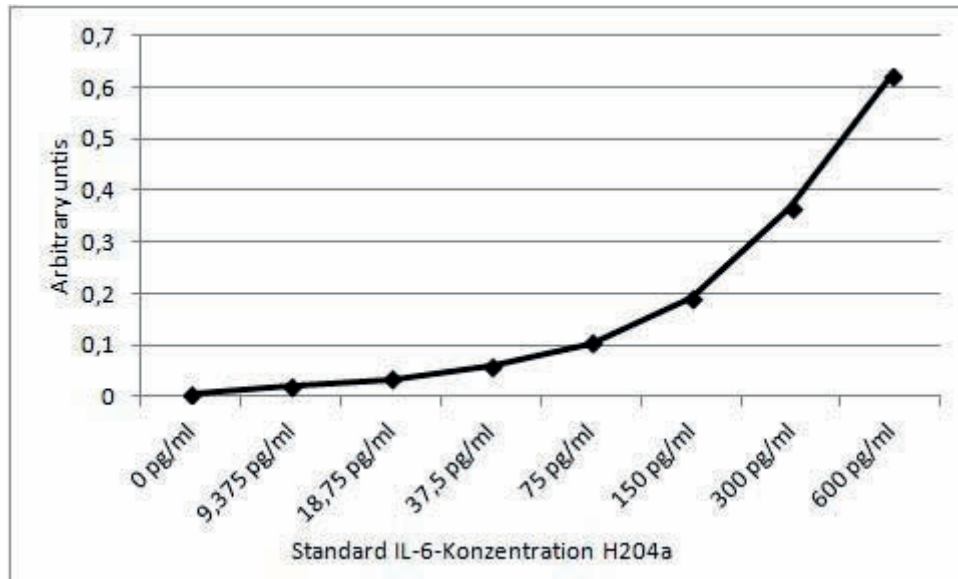


**Abbildung 39: Einfluss einer Behandlung der humanen CPC-Kultur H206 mit IL-6 spezifischer siRNA auf die IL-6 Expression im Kulturüberstand**

Nach Trypsinierung der CPC-Kultur H206 wird diese über 13 Tage mit der siRNA Hs\_IL6\_2 in unterschiedlicher Menge und 4,5 µl HiPerFect® transfiziert. Die im Anschluss isolierten Überstände wurden 1:1000 mit Aqua bidest verdünnt und im ELISA auf die IL-6-Menge untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messungen der jeweiligen Konstellation. Vor Trypsinieren (vor Tryp.), c.m. nach Trypsinieren, 25 nmol/l, 50 nmol/l und 75 nmol/l siRNA der CPC-Kultur H206 in pg/ml.

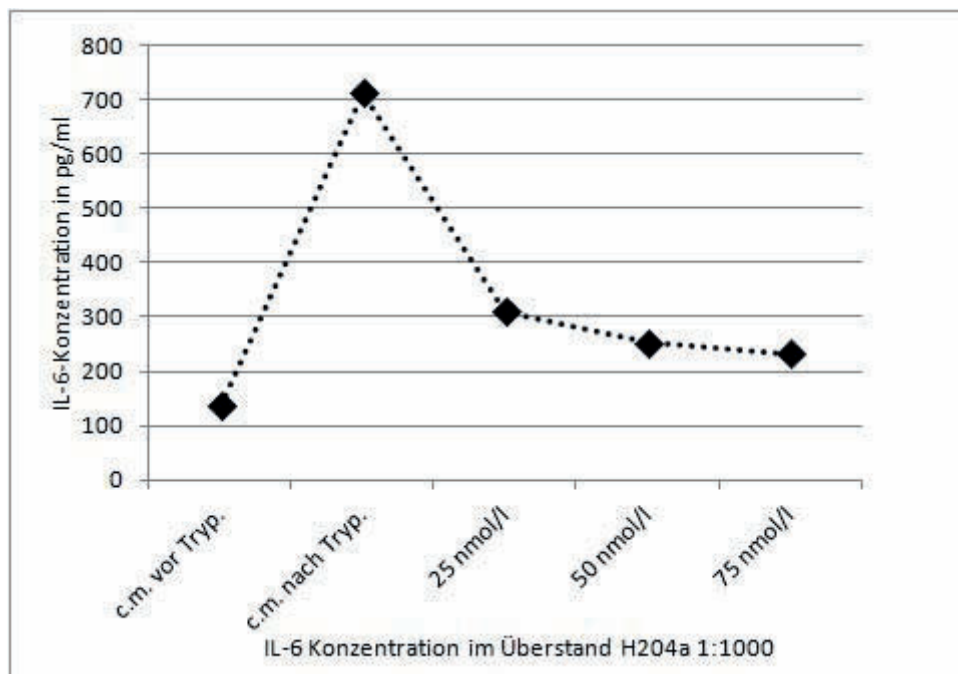
In der CPC-Kultur H204a wurde das gleiche „plain medium“ verwendet, da sie parallel zu H206 kultiviert wurde. Das „plain medium“ enthielt kein IL-6. Das „conditioned medium“ vor Trypsinieren enthielt bei dieser Kultur 85,9 ng/ml IL6, während das „conditioned medium“ nach Trypsinieren bereits 523,7 ng/ml IL-6 enthielt. Mit steigender siRNA-Konzentration ließ sich die IL-6 Konzentration auf 228,1 ng/ml bei 25 nmol/l siRNA, 185,2 ng/ml bei 50 nmol/l siRNA und letztlich auf 171, ng/ml bei 75 nmol/l siRNA bei einer eingesetzten Menge von 4,5 µl HiPerFect® reduzieren. Eine statistische Auswertung erfolgt aufgrund des geringen Probenumfangs nicht.

## Ergebnisse



**Abbildung 40: IL-6-Standardkonzentration H204a**

Um im ELISA eine zuverlässige Aussage über die IL-6-Konzentration treffen zu können, ist es möglich eine IL-S-Standardverdünnungsreihe zu erstellen. Dazu wurden schrittweise Konzentrationen von 0 bis 600 pg/ml im Doppelansatz auf jeder ELISA-Platte mitgeführt. Bei 450 und 550 nm wurde dann die Extinktion der Standardproben gemessen und in arbitrary units umgerechnet. So konnte die jeweilige IL-6-Konzentration einer bestimmten Menge an arbitrary units zugeordnet werden und dementsprechend die Konzentration in den Proben (s. Abb. 41) bestimmt werden.



**Abbildung 41: Einfluss einer Behandlung der humanen CPC-Kultur H204a mit IL-6 spezifischer siRNA auf die IL-6 Expression im Kulturüberstand**

Nach Trypsinierung der CPC-Kultur H204a wird diese über 13 Tage mit der siRNA Hs\_IL6\_2 in unterschiedlicher Menge und 4,5 µl HiPerFect® transfiziert. Die im Anschluss isolierten Überstände wurden 1:1000 mit Aqua bidest verdünnt und im ELISA auf die IL-6-

## Ergebnisse

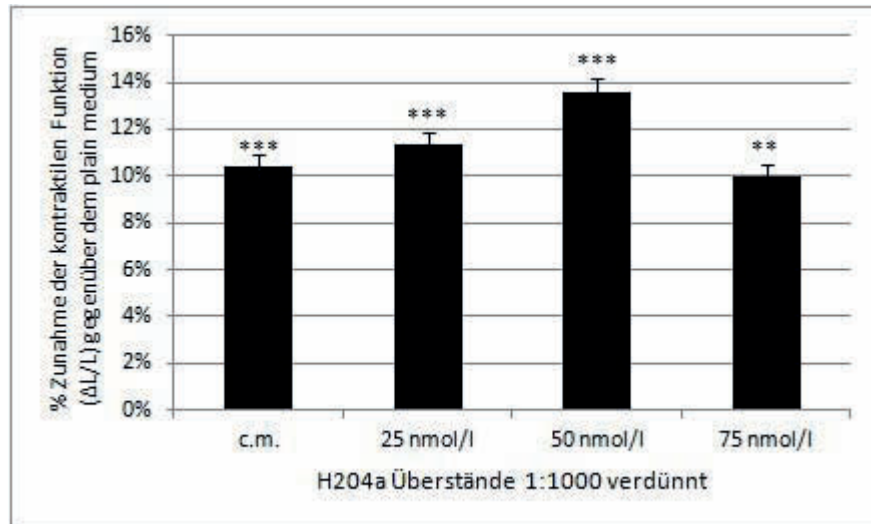
Menge untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messungen der jeweiligen Konstellation. Vor Trypsinieren (vor Tryp.), c.m. nach Trypsinieren, 25 nmol/l, 50 nmol/l und 75 nmol/l siRNA der CPC-Kultur H204a in pg/ml.

### **4.8 Wirkung humaner mit siRNA gegen IL-6 behandelter CPC-Kulturüberstände auf isolierte Kardiomyozyten**

Ziel dieses Versuches war es, die Effekte der unter Kap. 4.7 gewonnenen Überstände der humanen CPC-Kulturen auf die kontraktile Funktion isolierter Kardiomyozyten normotensiver Ratten zu untersuchen. Dazu wurden die Überstände 1:100 mit steril filtriertem Aqua bidest verdünnt (Müller 2010) und isolierte Kardiomyozyten für 24 Stunden mit je 10 µl dieser Verdünnung inkubiert (1:10 000). Anschließend erfolgte deren Elektrostimulation und Längenvermessung wie in Kap. 3.1.3 beschrieben. Dieses Experiment wurde mit dem Überstand von Zellkulturschalen der humanen CPC-Kultur H204a durchgeführt. Zum Einsatz kam „conditioned medium“ (c.m.) welches nicht mit siRNA behandelt wurde und solches, welches mit der IL-6 spezifischen siRNA Hs-IL-6-2 in den Konzentrationen von 25, 50 und 75 nmol/l in Gegenwart von 4,5 µl HiPerFect® transfiziert worden war. Die Mittelwerte der Kontrollen („plain medium“) wurden wieder auf 0% gesetzt und die prozentuale Zunahme der kontraktilen Funktion dargestellt (Abb. 42).

Basierend auf dem Wissen, dass der Überstand von CPC-Kulturen ohne exogenen Zusatz von Zytokinen („conditioned medium“) bereits IL-6 enthält, erfolgte die Zunahme der kontraktilen Funktion isolierter Kardiomyozyten wie erwartet um  $10,4\% \pm 0,5\%$  gegenüber der Kontrolle (Abb. 42). Die Überstände der mit 25, 50 und 75 nmol/l IL-6 spezifischer siRNA behandelten CPC-Zellkulturen bedingten ebenfalls gegenüber der Kontrolle signifikante Steigerungen der  $\Delta L/L\%$  Werte um  $11,3\% \pm 0,5\%$ ,  $13,6\% \pm 0,6\%$  resp.  $10,0\% \pm 0,6\%$ . Es ergaben sich keine signifikant unterschiedlichen Effekte im Vergleich zur Inkubation der Kardiomyozyten lediglich mit dem „conditioned medium“. Die in Abb. 41 angedeutete Reduktion der IL-6 Produktion durch Transfektion der CPC-Kulturen mit IL-6 siRNA hatte offensichtlich keinen hemmenden Einfluss auf die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten normotensiver Ratten. Dies unterstreicht die unter 4.1.1 dargestellte Sättigungskinetik der IL-6 Wirkung. Es wurden 100 Kardiomyozyten aus acht Zellkulturschalen (fünf Präparationen) charakterisiert.

## Ergebnisse



**Abbildung 42: Wirkung der Überstände von mit IL-6 siRNA-behandelten humanen CPCs auf die kontraktile Funktion isolierter Kardiomyozyten normotensiver Ratten**

Inkubation kultivierter Kardiomyozyten männlicher normotensiver Wistar-Hannover-Ratten in CCT-Nährmedium für 24 Stunden mit final 1:10000 verdünnten Überständen von humanen „cardiac progenitor cell“ (CPC) Kulturen. Die CPC-Kulturen wurden für 13 Tage mit 25, 50 resp. 75 nmol/l IL-6 spezifischer siRNA transfiziert. Als Positivkontrolle dient der Überstand nicht-transfizierter CPC-Kulturen (c.m. = conditioned medium) sowie als eigentliche Kontrolle das „plain medium“ (nicht dargestellt). Dargestellt ist der Einfluss der CPC Vorbehandlung auf die kontraktile Funktion ( $\Delta L/L$ -%) nach Elektrostimulation (0,5 Hz, 20 V, 5 ms) von 100 normotensiven Kardiomyozyten; der gemittelte Kontrollwert wurde zu 0  $\Delta L/L$ -% gesetzt. Statistischer Vergleich der arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM mittels einfaktorieller ANOVA und Bonferroni post-hoc Test. Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (\*/#/+),  $p \leq 0,01$  (\*\*/##/++),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*/###/+++).

## **5 Diskussion**

### **5.1 Zytokine im Allgemeinen**

Zytokine spielen eine entscheidende Rolle im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen. Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe Wenzel/Maxeiner wiesen eine vermehrte Expression der fünf in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zytokine in Überständen kardialer Progenitorzellkulturen der drei Spezies Mensch, Maus und Ratte nach (Krehbiehl 2010; Maxeiner et al. 2010, 2014). Aufbauend auf vorläufigen funktionellen Daten der Arbeitsgruppe erfolgte deshalb in der vorliegenden Arbeit eine detaillierte Analyse der modulatorischen Wirkung der Zytokine IL-6, IL-8, MCP-1, GDF-15 sowie von TIMP-1 auf die kontraktile Funktion isolierter Kardiomyozyten des Rattenherzens.

Generell wird die Rolle der Zytokine in der Fachliteratur kontrovers diskutiert. So wird proinflammatorischen Zytokinen eine kardioprotektive Wirkung nach einem ischämischen Insult des Myokards zugeschrieben (Frangogiannis 2004a; Fujio et al. 2011; Jezierska-Wozniak et al. 2011; Sharma and Das 1997). Andere Arbeitsgruppen wiederum sind der Meinung, proinflammatorische Zytokine spielen im Rahmen der Pathologie der Entwicklung des kongestiven Herzversagens eine entscheidende Rolle (Aukrust et al. 1999). Liegt keine systemische Infektion vor, so werden Zytokine organspezifisch reguliert und sind dann nur im betroffenen Gebiet zu detektieren (Tonnessen et al. 2003). Daten aus tierexperimentellen Untersuchungen zeigen eine langanhaltende Zytokinexpression in dem Gewebe, das den Myokardinfarkt unmittelbar umgibt (Gulletstad et al. 2012). Es wurden erhöhte Zytokin-Konzentrationen bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz im Plasma nachgewiesen und ihnen eine entscheidende Rolle in Prozessen wie dem kardialen „Remodeling“, der Fibrose, der Apoptose und auch der direkt modulierenden Wirkung auf Kardiomyozyten zugeschrieben (Collier et al. 2011; Damas et al. 2000; Gulletstad et al. 2012). Im Folgenden werden unter 5.2 die fünf Mediatoren im Hinblick auf ihre Wirkung im kardialen Remodeling im Einzelnen diskutiert.

### **5.2 Zytokine im Speziellen**

#### **5.2.1 Interleukin-6**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Konzentrationen von  $\geq 10$  ng/ml IL-6 einen „kontraktilitätssteigernden“ Effekt auf isolierte Kardiomyozyten der Ratte hatten. Bei gesunden Menschen ist IL-6 im Serum messbar. Bei signifikanter Streuung der gemittelten Basalwerte von  $\leq 1$  pg/ml, 3,3 pg/ml oder 5,1 pg/ml (Renz

## Diskussion

2014; Robak et al. 1998; Schneider 2014) wurden hingegen bei entzündlichen Herzerkrankungen Konzentrationen von  $\geq 1000$  pg/ml gemessen. Auch bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz, welche in die NYHA-Klasse I-III eingeordnet wurden, ergaben sich Konzentrationen von bis zu 300 pg/ml im Serum (Friedland et al. 1992); Test et al. 1996). Auch im Myokard selbst ist IL-6 messbar. Im ischämisch geschädigten Myokard am Mausmodell ist die IL-6 Konzentration um mehr als das Dreifache höher als im restlichen, nicht-ischämischen Gewebe (Kobara et al. 2010). IL-6 wird in Fibroblasten, Endothelzellen und Kardiomyozyten gebildet, wobei es bei Letzteren nur unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesen wurde (Gwechenberger et al. 1999; Schmidt et al. 2000; Sharma and Das 1997).

Die zellulären IL-6 Wirkungen werden über einen membranständigen IL-6R vermittelt, welcher von Maxeiner et al. (2014) auch an Kardiomyozyten nachgewiesen wurde. Dieser bindet an das Protein gp130 und löst so den intrazellulären Signalweg aus. Zellen, welche keinen eigenen IL-6 Rezeptor exprimieren, können über einen sIL-6R (löslichen IL-6 Rezeptor) ebenfalls gp130 aktivieren und so den IL-6 Signalweg auslösen (Rose-John 2012).

Neben den auf der einen Seite negativen Eigenschaften im Zusammenhang mit einer Herzinsuffizienz, wird IL-6 ebenfalls eine wichtige positive Rolle im „Remodeling“ des erkrankten Herzens zugeschrieben (Huang et al. 2014; Melendez et al. 2010). Das „Remodeling“ wird definiert als Genomexpressionsänderung, welche sich durch molekulare, zelluläre und interstitielle Veränderungen klinisch in einer Änderung der Herzgröße, Form und Funktion manifestiert. Es ist eine Reaktion des Herzens auf Verletzungen und/oder Überladungen (Cohn et al. 2000). Um die lebensnotwendige Pumpfunktion des Herzens aufrecht zu erhalten, wird das zerstörte Myokard durch fibrotisches Gewebe ersetzt und das nicht-geschädigte Myokard zur kompensatorischen Hypertrophie angeregt (Deten et al. 2002; Zamilpa et al. 2014).

So gibt es unzählige Beispiele, in denen IL-6 eine entscheidende Rolle in diesem Kontext spielt. So reduzierte die Verabreichung von IL-6 und IL-6R die Apoptose der Kardiomyozyten und die Infarktgröße nach Myokardinfarkt in Mäusen (Matsushita et al. 2005). Einer Studie von Deten et al. zufolge, spielt IL-6 zusammen mit IL-1beta in der akuten Phase des „Remodelings“ nach einem Myokardinfarkt eine entscheidende Rolle bei der Resorption nekrotischen Gewebes, dem Umbau der Zellmatrix und der Wundheilung (Deten et al. 2002). Ergänzend dazu zeigten Kobara et al. (2010), dass sich mittels IL-6 Antikörpern die akute Phase der Inflammation zwar verringern lässt, es aber zu einer schlechteren Wundheilung kommt. Sie postulierten, dass die zytokin-

## Diskussion

medierte Inflammation im Anschluss an ein ischämisches Geschehen zur Wundheilung beiträgt.

IL-6 reguliert zwar die angeborene Immunantwort, welche eine unkontrollierte Inflammation nach einem Myokardinfarkt induzieren kann (Huang et al. 2014), dennoch ist das „Remodeling“ zur Aufrechterhaltung der Pumpfunktion für das Herz obligat. Bei chronischem „Remodeling“ wird das Myokard durch fibrotisches Gewebe ersetzt; vor allem nach einem ischämischen Insult.

Allerdings führt ein zu starker Umbau des Herzens dann wieder zur klinischen Verschlechterung der Herzfunktion (Cohn et al. 2000). Gullestad et al. (2012) brachten IL-6 als proinflammatorisches Zytokin mit einer Reduzierung der Herzfunktion in Verbindung und stellten eine Korrelation der Schwere einer Herzerkrankung anhand der NYHA-Klassifikation und der Plasma-IL-6 Konzentrationen her (Test et al. 1996). Andere Arbeitsgruppen bewiesen die fibrosierende Wirkung von IL-6 in Kombination mit MCP-1, sowie deren negative Wirkung auf die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten durch direkte Effekte auf den intrazellulären Kalziumtransport und eine geänderte Signaltransduktion über adrenerge Rezeptoren (Kobara et al. 2010; Yu et al. 2005). In einer weiteren Studie an IL-6 Knock-out-Mäusen mit Myokardinfarkt konnte allerdings keinerlei Unterschied zwischen Überlebenszeit, Infarktgröße und „Langzeitremodeling“ gegenüber den Kontrolltieren gezeigt werden (Fuchs et al. 2003). Die zweischneidige Bedeutung von IL-6 wird dadurch unterstrichen, dass dieses Zytokin auf der einen Seite wichtig ist für den Ersatz untergegangenen Gewebes nach einem Myokardinfarkt (Arakelyan et al. 2005), andererseits aber auch zur deutlichen Ventrikelhypertrophie beiträgt (Hirota et al. 1995).

Einen deutlich positiven und wichtigen Effekt von IL-6 wiesen Maxeiner et al. bereits 2010 nach. In Überständen von kardialen Vorläuferkulturen war IL-6 das dominierende Zytokin (Maxeiner et al. 2014). Konditionierte Überstände dieser Kulturen zeigen einen positiven Effekt auf kontraktile Eigenschaften isolierter Kardiomyozyten. Die Expression des IL-6R in isolierten Kardiomyozyten konnte in diesem Zusammenhang ebenfalls nachgewiesen werden (Maxeiner et al. 2014; Scheufen 2012). In Übereinstimmung mit den damals erhobenen Daten konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls ein deutlich positiver IL-6 Effekt auf die kontraktile Funktion isolierter Kardiomyozyten dargestellt werden. Dieser Effekt war konzentrationsabhängig ausgeprägt und erstmals statistisch signifikant ab einer IL-6 Konzentration von 10 ng/ml. Auch höhere IL-6-Konzentrationen waren nicht in der Lage eine weitere Steigerung von  $\Delta L/L$  hervorzurufen, was auf eine Sättigungskinetik dieser Reaktion hindeutet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Bedeutung und Funktion von IL-6 nicht pauschal in negativ und positiv unterteilt werden kann. Dass es vielmehr wichtig ist, dieses Zytokin im Kontext des zugrunde liegenden Ereignisses zu sehen. Das jeweilige Studiendesign und die Sichtweise scheinen bedeutende Faktoren für das Verständnis der IL-6 Wirkungen am Herz zu sein. Die hier durchgeführten Versuche beweisen eine deutliche und robuste Steigerung der kontraktilen Funktion isolierter Kardiomyozyten der Ratte durch Zugabe von IL-6 in mittleren und hohen Konzentrationen nach 24-stündiger Inkubation.

### 5.2.2 Interleukin-8

Im Gegensatz zu IL-6 ist die physiologische Funktion von IL-8 am Herz bisher nur sehr spärlich untersucht und weitestgehend unklar. IL-8 wird unmittelbar vom Myokard gebildet, bindet Neutrophile an die Endotheloberfläche und führt so zur verbesserten Leukozytenaktivierung und Akkumulation (Cavalera and Frangogiannis 2014; Seino et al. 1995; Wan and Yim 1999), was eine Beteiligung in entzündlichen Prozessen nahelegt. Untermauert wird die Bedeutung von IL-8 im Myokard durch den Nachweis des IL-8R (Damas et al. 2000).

Die Ratte selbst besitzt ein IL-8 Äquivalent, welches Growth-regulated Gene Product (GRO) oder auch Cytokine-induced Neutrophil Chemoattractant (CINC) genannt wird und sowohl strukturell, als auch funktionell homolog ist (Himi et al. 1997; Seino et al. 1995). In der aktuellen Literatur wird dieses murine IL-8 Äquivalent mit humanem IL-8 gleichgesetzt.

Seit einigen Jahren werden erhöhte Serum-IL-8-Konzentrationen mit Herzinsuffizienzen in Verbindung gebracht und stehen in direktem Zusammenhang mit dem „outcome“ eines Patienten mit chronischer Herzerkrankung (Nymo et al. 2014; Shin et al. 2009; Trofimov and Poskrebysheva 2015). Interessanterweise korrelieren die IL-8 Konzentrationen mit denen des kardialen Troponin-I, einem Marker zur Bestimmung des Grades einer Herzerkrankung (Wan and Yim 1999). Abe et al. (1993) wiesen bei Patienten bis drei Tage nach einem Myokardinfarkt IL-8 Konzentrationen zwischen 13 und 1100 ng/l im Serum nach. IL-8 vermittelt über zwei Rezeptoren seine Wirkung: CXCR1 und CXCR2. Die Rezeptoren werden zum Beispiel von humanen mikrovaskulären Endothelzellen exprimiert, über welche IL-8 eine Schlüsselrolle in der Neovaskularisation nach einem Myokardinfarkt einnimmt (Cavalera and Frangogiannis 2014; Frangogiannis and Entman 2005). Die Signalkaskade mit vermehrter Freisetzung von intrazellulärem Kalzium könnte die Steigerung der kontraktilen Funktion isolierter Kardiomyozyten durch IL-8 auslösen und so für die von Sharma et al. (1997) postu-

lierte kardioprotektive Wirkung von Zytokinen wie IL-8, verantwortlich sein. Unterstützt wird diese Theorie durch die Tatsache, dass bei einem Myokardinfarkt etwa 1 ng/ml IL-8 im Serum vorhanden ist. Im Konsens zu diesen Daten kommt es in der vorliegenden Arbeit ebenfalls zu einer Steigerung der kontraktiven Funktion isolierter Kardiomyozyten ab einer IL-8 Konzentration von 1 ng/ml. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten werden von Abe et al. unterstützt, welcher ebenfalls eine Steigerung der kontraktiven Funktion bei 1 ng/ml und 10 ng/ml IL-8 zeigen konnte (Abe et al. 1993).

Wie IL-6 war auch IL-8 vermehrt in Überständen von CPC-Kulturen zu finden und nimmt in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle in der Regeneration des erkrankten Herzens ein (Scheufen 2012). In der hier vorliegenden Arbeit konnten die Konzentrationen von 1 ng/ml und 10 ng/ml einen deutlichen Effekt auf die kontraktiven Eigenschaften isolierter Myozyten ausüben. Diese Ergebnisse stehen damit im Einklang mit bereits publizierten Daten und unterstreichen die Bedeutung von IL-8 für das kardiale Remodeling.

### 5.2.3 Monocyte chemoattractant protein-1

MCP-1 steigert in Konzentrationen von 100 ng/ml und mehr die kontraktile Funktion isolierter Kardiomyozyten der Ratte. Es ist bekannt, dass neben Leukozyten und Endothelzellen auch Kardiomyozyten (Younce et al. 2014) MCP-1 im ischämischen Myokard exprimieren, womit ihm eine wichtige Rolle bei der Heilung eines Myokardinfarktes zugeschrieben werden kann (Cavalera and Frangogiannis 2014; Frangogiannis and Entman 2005; Morimoto et al. 2006). Neben der MCP-1 Expression von Kardiomyozyten wurde auch der MCP-1R an Kardiomyozyten nachgewiesen (Damas et al. 2000). MCP-1 rekrutiert in erster Linie phagozytierende mononukleäre Zellen und fördert zudem die Neovaskularisation (Cavalera and Frangogiannis 2014; Morimoto et al. 2006). Im Tierversuch detektierten Cavalera et al. (2014) einen deutlichen MCP-1-Anstieg nach einem Myokardinfarkt und de Lemos et al. (2003) untersuchten das Plasma von Patienten und schrieben MCP-1 eine Funktion als Pathogenitätsmarker für Atherosklerose und Myokardinfarkte zu. Ergänzend dazu wiesen Guo et al. (2013) eine Hochregulation von MCP-1 auf mRNA, wie auch auf Proteinebene im dilatierten Herz nach. Bei transgenen Mäusen führt eine Überproduktion von MCP-1 zu einer geringeren Infarktgröße und Narbenbildung und erfüllt damit eine Schutzfunktion vor linksventrikulärer Dysfunktion sowie einer reaktiven Kardiomyozytenhypertrophie (Kuwahara et al. 2004; Morimoto et al. 2006).

Um die Funktion von MCP-1 besser verstehen zu können, beschäftigen sich viele Studien mit dem Verlust von MCP-1. Als Modelle kommen hier beispielsweise MCP-1

Knock-out-Tiere oder auch die Gabe von MCP-1 Antikörpern in Frage. Ein Verlust von MCP-1 bewirkte ein geringeres linksventrikuläres „Remodeling“, wobei die Infarktgröße im Wesentlichen unverändert blieb. Zusammen mit einem Anstieg der Makrophageninfiltration in das ischämische Myokard zeigten die Tiere ein reduziertes dilatatives „Remodeling“. Es kam zur deutlich reduzierten Expression proinflammatorischer Gene (Cavalera and Frangogiannis 2014; Frangogiannis and Entman 2005). Durch den Einsatz von MCP-1 Antikörpern ließ sich die Fibroblastenproliferation und damit die myokardiale Fibrose zwar reduzieren, resultierte aber in einer diastolischen Dysfunktion mit verminderter Ejektionsfraktion (Collier et al. 2011; Kuwahara et al. 2004).

Wie auch in den Fällen von IL-6 und IL-8 wird die Bedeutung von MCP-1 im Rahmen des kardialen Remodellings kontrovers diskutiert. So finden sich ebenfalls Studien, bei denen MCP-1 eine negative Rolle zugeschrieben wird. Dabei wurden Ratten beispielsweise vor einem ischämischen Insult mit MCP-1 Antikörpern behandelt und anschließend die Infarktgröße bestimmt (Ono et al. (1999)). Im Gegensatz zu den vorangegangenen Untersuchungen reduzierte sich hierdurch das Infarktareal. Gullestad et al. (2012) wiesen erhöhte Monozyteninfiltrationen ins Myokard mit anschließender Hypertrophie und Ventrikeldilatation, sowie gehemmter kontraktile Funktion bei MCP-1 Überexpression nach. Durch den Einsatz eines Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten hemmten Behr et al. (2004) die MCP-1 Expression und damit die Makrophageninfiltration. Dieser Effekt schützte die linksventrikuläre systolische Funktion und verminderte das „Remodeling“. Arakelyan et al. (2005) untersuchten das Plasma herzgesunder und herzkranker Patienten und detektierten bei gesunden Personen bis zu 239 pg/ml und bei erkrankten 384 pg/ml MCP-1 im Plasma. Die vorliegende Arbeit unterstützt erneut den ambivalenten Charakter einzelner Mediatoren und unterstreicht die positive Bedeutung von MCP-1 für die kontraktile Funktion isolierter Kardiomyozyten.

### 5.2.4 Growth differentiation factor-15

GDF-15 gehört zur Superfamilie der transforming growth factors (TGF)-beta, welcher im Herz nur unter kardialen Stress gebildet wird (Liu et al. 2013; Kempf et al. 2007; Xu et al. 2006). Im Herzen von Kardiomyozyten freigesetzt, kann er in Konzentrationen von maximal 1,2 ng/l (entspricht 1,2 pg/ml) gemessen werden (Secchiero et al. 2007). Als relativ neuer Biomarker für eine Herzerkrankung korrelieren die Konzentrationen von GDF-15 mit den NYHA-Klassen und NT-pro-BNP-Spiegeln (Kempf et al.

2007). Heute stellt GDF-15 als Biomarker ein wichtiges Element in der Diagnostik von Herzerkrankungen dar (Schopfer et al. 2014).

Durch Hemmung der Inflammation, Apoptose, Hypertrophie und ungünstigem „Remodeling“ im erkrankten Herz, schützt GDF-15 das Herz auf diesen Wegen vor größeren Schäden (Cavalera and Frangogiannis 2014; Frangogiannis 2012; Heger et al. 2010; Kempf et al. 2007; Kuwahara et al. 2004; Secchiero et al. 2007). Allerdings führt die durch GDF-15 gehemmte Hypertrophie des Myokards auch zu einer verminderten Leistungsfähigkeit (Xu et al. 2006).

Kempf et al. (2011) beschrieben eine erhöhte Inzidenz von Herzrupturen bei GDF-15 defizienten Mäusen; es kam zu einer übermäßigen Adhäsion von Leukozyten am Endothel, welche physiologisch durch GDF-15 verhindert wird. Die Untersuchung von isolierten Kardiomyozyten der Ratte in Bezug auf die kontraktile Funktion nach Inkubation mit (100 pg/ml – 1 µg/ml) unterschiedlichen GDF-15 Konzentrationen, zeigte keinen signifikant steigernden oder hemmenden Einfluss.

In der Literatur gibt es keine Hinweise auf die GDF-15 Wirkungen an isolierten Kardiomyozyten oder auf deren kontraktile Funktion. Eine mögliche Erklärung wäre, dass GDF-15 lediglich im hypertroph erkrankten und nicht im gesunden Herz vorkommt (Xu et al. 2006). Die untersuchten Kardiomyozyten stammten von jungen, gesunden Ratten, in welchen eine fehlende Expression von GDF-15 auch ein Nichtvorhandensein der Rezeptoren zur Folge haben könnte. Die Expression geeigneter Rezeptoren (außer für IL-6) wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Diese muss bei der Interpretation der gewonnenen Ergebnisse berücksichtigt werden. In der hier gewählten Versuchsanordnung hatte GDF-15 keinen positiven Einfluss auf die Kardiomyozytenfunktion. Allerdings muss weiterhin berücksichtigt werden, dass natürlich neben der Steigerung der kontraktilen Funktion noch weitere Mechanismen verantwortlich sind für ein positives Remodelling, wie zum Beispiel die Hemmung der Inflammation oder eine verminderte Apoptoserate (Cavalera and Frangogiannis 2014; Kempf et al. 2006).

### 5.2.5 Tissue inhibitor of metalloproteinases-1

TIMP-1 ist ein natürlicher Inhibitor der MMPs, hat anti-apoptotische Funktionen und ist in der Lage, die Zellproliferation in vielen verschiedenen Zelltypen zu fördern (Gendatbank der National Center for Biotechnology Information; Uchinaka et al. 2014). Bildungsorte von TIMP-1 sind neben Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen auch Kardiomyozyten (Creemers et al. 2003). Bei Patienten mit systemischer Hypertonie konnten Plasma-TIMP-1 Spiegel von etwa 358 ng/ml ge-

## Diskussion

messen werden (Lindsay et al. 2002). Zu den bisher bekannten Aufgaben von TIMP-1 zählt die Hemmung der MMPs, welche für das „Remodeling“ der extrazellulären Matrix zuständig sind (Foronjy et al. 2008). Das Verhältnis von MMPs und TIMPs gibt Aufschluss über das „Remodeling“ der linken Herzkammer (Weir et al. 2011). In einer groß angelegten Studie korrelierten TIMP-1 Serumkonzentrationen mit der linksventrikulären Masse und der Wanddicke des Herzens, ein möglicher TIMP-1 medierter Prozess, da es die Fibroblastenproliferation, nicht aber die Kollagensynthese stimulierte (Hansson et al. 2009; Lovelock et al. 2005; Sundstrom et al. 2004). Dazu passt, dass TIMP-1 mit einer diastolischen Dysfunktion im chronisch volumenüberladenen Herzen und dem Grad der Fibrose beim Menschen korreliert. Eine häufige Folge der fortgeschrittenen kardialen Fibrose ist Kammerflimmern (Elmas et al. 2007; Heymans et al. 2005).

Creemers et al. (2009) haben bei TIMP-1 Knock-out-Mäusen eine deutlich stärkere Hypertrophie, weniger fibrilläres Kollagen und eine herabgesetzte linksventrikuläre Kontraktionsfunktion nachgewiesen. Allerdings wurden diese Messungen zwei Wochen nach einem Myokardinfarkt durchgeführt, was die chronischen Effekte von TIMP-1 darstellen dürfte.

Lindsay et al. (2002) identifizierten TIMP-1 als Marker für eine asymptomatische linksventrikuläre diastolische Dysfunktion. In Patienten, mit einem echokardiologisch untersuchten, verminderten diastolischen Füllungsgrad der linken Herzkammer, korrelieren die Plasmaspiegel von TIMP-1 mit dem Ausmaß der Erkrankung. Die „Framingham heart study“ macht eine negative Korrelation zwischen steigenden TIMP-1 Plasma-Konzentrationen und der kontraktile Funktion deutlich; die TIMP-1 Konzentrationen lagen in der Studie zwischen 447 ng/ml und 1410 ng/ml (Sundstrom et al. 2004). Diese Feststellungen decken sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit, bei welcher 1 ng/ml TIMP-1 den stärksten positiven Effekt auf die kontraktile Funktion isolierter Kardiomyozyten hatte. Die in dieser Arbeit in Folge eingesetzten höheren TIMP-1 Konzentrationen führten zur Hemmung der kontraktile Funktion isolierter Kardiomyozyten der Ratte und deuten daher auf eine negative Konzentrations-Wirkungsbeziehung hin. Diese Beobachtungen unterstützen weitere Ergebnisse der oben genannten Studie, welche die TIMP-1 Konzentration als wichtigen kardialen Risikofaktor beschreibt und den Faktor als einen Indikator für linksventrikuläre Hypertrophie und systolische Dysfunktion (Sundstrom et al. 2004) sieht. Wieso niedrige TIMP-1 Konzentration einen durchaus positiven Effekt auf die kardiale Funktion ausüben, kann anhand der in der Literatur befindlichen Daten und der vorliegenden Ergebnisse nicht geklärt werden. Sicherlich ist auch hier der zeitliche Zusammenhang, das Zu-

sammenspiel mit weiteren Zytokinen und die Art der zugrunde liegenden Ursachen entscheidend.

### 5.3 Kombinationen

Die Untersuchung der fünf Zytokine in jeweils Zweierkombinationen wurde in unterschiedlichen Versuchsanordnungen durchgeführt:

- 1) die Kombination von Konzentrationen, welche in den Einzelmessungen erste signifikante Effekte erzielten (hohe Konzentrationen),
- 2) die Kombinationen von Konzentration, welche in den Einzelmessungen keine Effekte erzielten (niedrige Konzentrationen) und
- 3) die Kombinationen hoher Konzentration unter Zugabe spezifischer Antikörper.

Zu 1) Bemerkenswert ist, dass in den hohen Konzentrationen solche Kombinationen eine signifikante Steigerung der kontraktilen Funktion hervorriefen, bei welchen IL-6 mit appliziert wurde. Die Steigerung der kontraktilen Funktion war in allen Fällen nicht signifikant erhöht gegenüber IL-6 alleine, jedoch gegenüber dem zweiten Zytokin (IL-8 und GDF-15). Dieses Ergebnis beweist einen verstärkenden Charakter von IL-6 im Kontext mit anderen Zytokinen. Darüber hinaus führte neben den Kombinationen, in den IL-6 beteiligt war, auch die Kombination aus IL-8 und TIMP-1 zu einer Steigerung der kontraktilen Funktion.

Bei den vier Kombinationen mit Beteiligung von IL-6, führte die Kombination aus IL-6 und IL-8 zu der stärksten Zunahme der kontraktilen Funktion von über 26% gegenüber der Kontrolle. IL-6 alleine induzierte eine Zunahme der kontraktilen Funktion von lediglich ca. 15 % und IL-8 von nur ca. 12 % (Abb. 25 und 25).

Es gibt nur wenige Untersuchungen über die Kombination einzelner Zytokine und deren Wirkung auf Kardiomyozyten. Jedes der in dieser Studie untersuchten Zytokine wurde bereits in Bezug auf Bildungs- und Wirkungsort sowie Funktion sehr genau charakterisiert; bei Kombinationsmessungen kamen meist ganze Zytokin-Cocktails zum Einsatz (Joulin et al. 2007; Krehbiehl 2010; Müller 2010). Selten nur wurden zwei oder wenige Zytokine und deren gemeinsame Wirkung auf Zellen oder Organsysteme getestet.

## Diskussion

Die Kombination aus hohen IL-6 und IL-8 Konzentrationen lässt sich im Plasma septischer Patienten nachweisen. In einem Versuchsaufbau, welcher in den Grundzügen dem hier durchgeführten ähnelt, wurde septisches Plasma auf Kardiomyozyten von Ratten aufgetragen, woraufhin es zu einer Hemmung der kontraktilen Funktion von Kardiomyozyten kam. IL-8, IL-6 und anderen Zytokinen wurde daraufhin eine kardio-depressive Wirkung zugesprochen (Joulin et al. 2007). Die hier durchgeführten Versuche der Kombination aus IL-6 und IL-8 zeigten hingegen einen deutlich positiven Effekt auf die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten. Im Gegensatz zu dem oben genannten septischen Plasma, – in welchem weitere Faktoren eine Rolle spielen dürften – kamen hier klar definierte Konzentrationen zweier Zytokine zum Einsatz. Andere Arbeitsgruppen ordneten Zytokinen wie IL-8 und anderen eine Induktion der zytoprotektiven Antwort im reperfundierten Myokard nach einem Infarkt zu (Sharma and Das 1997). Wieder andere Autoren detektierten noch Tage nach einer Operation am Herzen stark erhöhte IL-6- und IL-8 Konzentrationen im Plasma und wiesen eine Überexpression von IL-8 in Kardiomyozyten nach (Pasnik et al. 2007). Chan et al. (2004) haben sich mit der Zytokin-Expression von IL-6 und IL-8 im Skelettmuskel beschäftigt. Bei moderatem Training stieg die mRNA-Expression von IL-6 und IL-8 signifikant an und war ganz offensichtlich von den intramuskulären Glycogenreserven abhängig. Nach leichtem Training war die IL-6 Konzentration im Plasma bis um das 100-fache höher als ohne Training (Pedersen et al. 2007). Vor allem IL-6 aber auch IL-8 spielen also eine wichtige, noch nicht im Detail identifizierte Rolle bei der leicht- bis mittelgradig gesteigerten Arbeit des Skelettmuskels. Diese Befunde dürften jedoch nur bedingt auf den Herzmuskel übertragbar sein. Zusammengenommen scheint es, als könnte die Kombination aus IL-6 und IL-8 in erhöhter Konzentration mit gesteigerter Muskelarbeit in Verbindung gebracht werden, was die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt.

Die Kombination aus IL-6 und MCP-1 führte zu einer nachhaltigen Stimulation der STAT3-Aktivierung in Kardiomyozyten, einem Protein, welches auf Zytokine und Wachstumsfaktoren reagiert und die Einleitung von Zellwachstum und Apoptose initiiert. Unter Hypoxie förderten MCP-1 und IL-6 die Differenzierung kardialer Fibroblasten in Myofibroblasten (Morimoto et al. 2006). Die Autoren fanden weiter heraus, dass MCP-1 die IL-6 Sekretion und damit die linksventrikuläre Hypertrophie nach einem Myokardinfarkt induzierte. Auch hier ist es wiederum sehr erstaunlich, dass die Steigerung der kontraktilen Funktion in Kombination zwar erhöht ist gegenüber MCP-1 alleine, aber nicht gegenüber IL-6.

## Diskussion

Sowohl bezüglich der Kombinationen aus GDF-15 und IL-6 als auch bezüglich TIMP-1 und IL-6 gibt es in der Literatur nur wenige spezifische Daten. Hier sind vor allem deskriptive Beschreibungen zur gemeinsamen Expression der genannten Zytokine im Zuge kardialer Insulte zu nennen (Hohensinner et al. 2003, Barton et al 2003)

Die hier dargestellten Daten zeigen aber auch in diesen Fällen, dass IL-6 mit Nichten einseitig betrachtet werden darf, dass es vielmehr in der Lage ist, sehr vielfältig und variabel die Wirkung weiterer Mediatoren positiv zu modulieren.

Eine ebenfalls deutliche Steigerung der kontraktilen Funktion zeigte die Kombination aus TIMP-1 und IL-8. Diese beiden spielen laut Elmas et al. (2007) gemeinsam eine wichtige Rolle in der Interaktion mit dem Koagulationssystem. Speziell auf das Herz bezogen, fand man erhöhte IL-8- und TIMP-1 Konzentrationen im Plasma von Patienten mit Kammerflimmern. Und auch Helseth et al. (2015) fanden bei Herzinfarktpatienten eine erhöhte IL-8- und TIMP-1 Expressionen. Sie fanden eine positive Korrelation zwischen dem Anstieg der Zytokine und der erfolgten Ischämiezeit im Herzen. Allerdings betrachten beide Publikationen stets noch weitere Zytokine, welche im Fall eines Herzinfarktes oder Kammerflimmers eine Rolle spielen. Die isolierte Betrachtung von IL-8 und TIMP-1 und eine mögliche Beurteilung der alleinigen Wirkung zeigen auch hier wiederum einen klaren synergistischen Effekt.

Zu 2) Nachdem deutliche und signifikante synergistische Effekte bei hohen Konzentrationen gezeigt werden konnten, stellte sich die Frage, ob eine Kombination aus alleine unwirksamen Konzentrationen zu einer Steigerung der kontraktilen Funktion führt. Aus diesem Grund wurde für alle Mediatoren die jeweils niedrigere Konzentration gewählt und gleichzeitig die letzte Konzentration, bei der es in der Einzelmessung zu keiner signifikanten Steigerung kam. Limitierend bei dieser Untersuchung ist die Tatsache, dass hier als Positivkontrollen keine Einzelmessungen durchgeführt wurden. Dies erscheint aber insofern erlässlich, als das bei fast allen untersuchten Kombinationsmessungen keine signifikanten Abweichungen von der Negativkontrolle ermittelt werden konnten. Lediglich die Kombination aus IL-6 und GDF-15 führte mit einer Steigerung der kontraktilen Funktion auf 7,52% gegenüber der Kontrolle zur stärksten Zunahme unter den untersuchten niedrigen Zytokinkombinationen. Zwar war diese geringe Steigerung in der Auswertung statistisch relevant, kam aber nicht an signifikante Werte der Einzel- oder Kombinationsmessungen heran. Die Interpretation dieser Befunde erscheint schwierig, da tatsächlich kaum Literaturdaten vorliegen. Eine Schlussfolgerung scheint allerdings möglich, nämlich die, dass auch die Kombination aus niedrigen Zytokinkonzentrationen nicht zu einer Steigerung der kontraktilen

## Diskussion

Funktion führt. Dass vielmehr für einen synergistischen Effekt schon Einzeleffekte zwingend nötig sind.

Zu 3) Der Zusatz von Zytokin-spezifischen Antikörpern unterstrich vor allem den herausragenden Effekt von IL-6 in dieser Arbeit. Die Kombination von IL-6 und IL-8 führte zur signifikanten Steigerung der kontraktilen Funktion, welche durch die Zugabe des spezifischen IL-6 Antikörpers deutlich gehemmt wurde. Wurde dieser Kombination ein spezifischer IL-8 Antikörper zugegeben, blieb die Hemmung der kontraktilen Funktion aus. Dieses Ergebnis verdeutlicht die besondere Stellung von IL-6 in diesem Kontext, als Zytokin, welches in einem großen Ausmaß für die positiven Effekte auf die kontraktile Funktion isolierter Kardiomyozyten verantwortlich war.

Bei der Betrachtung vieler Publikationen wird deutlich, dass ein pathologisches Ereignis stets zur Veränderung einer Vielzahl von Zytokinen im Organismus führt (Tonnessen et al. 2003, Collier et al. 2011, Iqbal et al. 2013, u.v.a.). Bereits 2014 wurde der Einsatz von Zytokinen und deren Inhibitoren als Therapie bei Herzerkrankungen beschrieben (Askevold et al. 2014; Cavalera and Frangogiannis 2014; Frangogiannis 2004b). Es dürften aber noch viele offene Fragen zu beantworten sein, bevor diese zur sicheren Anwendung kommen können, denn die hier dargestellten Untersuchungen unterstreichen den ambivalenten Charakter vieler Zytokine: während einige Autoren z.B. IL-6 die Beteiligung an der myokardialen Dysfunktion bei einem Infarkt zuschreiben, sehen andere in der gleichen Situation die Notwendigkeit von IL-6 für Heilung des infarzierten Gewebes (Hirota et al. 1995; Sharma et al. 2007).

Die in dieser Arbeit untersuchten Zytokine führten alle, mit Ausnahme von GDF-15, in unterschiedlichen Konzentrationen, einzeln und in Kombination zur Steigerung der kontraktilen Funktion isolierter Kardiomyozyten der Ratte.

Um die Lebensfunktionen aufrecht zu erhalten, ist der Organismus darauf angewiesen, dass das Herz eine konstante Leistung erbringt. Es ist nur schwer vorstellbar, dass die einzelnen Kardiomyozyten über viele Jahrzehnte hinweg ihre Leistung erbringen, ohne jemals Reparatur- und Erneuerungsmechanismen unterworfen zu sein. Heute ist bekannt, dass das Herz eigene Vorläuferzellen - die kardialen Progenitorzellen – beherbergt, deren Wirkungsweisen bisher nur marginal erforscht sind (Bearzi et al. 2007, Beltrami et al. 2003, Bergmann et al. 2009, u.v.a.). Sie sezernieren Zytokine und andere bioaktive Substanzen, die parakrin auf umliegende Zellen wirken (Maxeiner et al. 2010). Es scheint, als werden im Fall einer Herzerkrankung Zytokine in besonders großen Mengen freigesetzt (Shin et al. 2009). Die vorliegende Arbeit stellte die Effekte der einzelnen, bzw. in Kombination verwendeten Zytokine auf iso-

lierte Kardiomyozyten dar. Die Zellen der noch später diskutierten CPC-Kulturen sezernieren Substanzen, welche die damit inkubierten isolierten Kardiomyozyten im Bezug auf die kontraktile Funktion positiv beeinflussten. Diese Wirkungsweise könnte ausschlaggebend für die Aufrechterhaltung der Pumpfunktion des erkrankten Herzens, wie zum Beispiel im Falle eines Myokardinfarktes, sein. Die möglicherweise von Progenitorzellen freigesetzten Zytokine könnten so parakrin auf nicht geschädigte, vitale Kardiomyozyten wirken und diese zu einer höheren Leistung stimulieren, um den Ausfall geschädigten Myokards auszugleichen.

### **5.4 Die Ursache der gesteigerten kontraktile Funktion – SERCA/NCX-Verhältnis**

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, die Steigerung der kontraktile Funktion sei in einer veränderten Zusammensetzung der Kalziumkanäle SERCA und NCX zu erklären. Postuliert wurde, dass es zu einem vermehrten Einbau der SERCA in Relation zu einem geringeren Einbau des NCX an der Zellmembran komme. Diese Konstellation führt zuerst zu einer vermehrten Kalziumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) und bei den folgenden Depolarisationen zu dessen vermehrten Freisetzung. Nur das im SR gespeicherte Kalzium beeinflusst die Kontraktionskraft maßgeblich.

Bevor auf die unterschiedlichen, die SERCA-Expression beeinflussenden Faktoren eingegangen wird, muss gesagt sein, dass eine große Vielzahl an SERCA-Isoformen in einer Zelle vorkommen können; Ursache dafür ist das Spleißen der SERCA-Transkripte. Es können auf Proteinebene mehr als zehn verschiedene SERCA-Isoformen nachgewiesen werden (Periasamy and Kalyanasundaram 2007; Stammers et al. 2015). Bei Nagetieren ist die SERCA zu rund 90% für die Elimination des intrazellulären Kalziums aus dem Zytoplasma nach der Kontraktion zuständig, während es beim Menschen lediglich 76% (Bassani et al. 1994; Li et al. 1998; Piacentino et al. 2003) sind. Periasamy et al. (2007) zeigten außerdem, dass die SERCA-Pumpfunktion, die Expression und die Aktivität vom Alter und den pathophysiologischen Umständen einer Herzinsuffizienz abhängig sind. Vorangegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe Wenzel/Maxeiner wiesen nach, dass eine gesteigerte kontraktile Funktion isolierter Kardiomyozyten nach Induktion mit den konditionierten Überständen kardialer Vorläuferzellkulturen mit einer Veränderung des SERCA-/NCX-Verhältnisses zugunsten einer vermehrt exprimierten SERCA einhergeht (Maxeiner et al. 2010). Anwar et al. (2005) machten deutlich, dass es hypertrophierte isolierte Kardiomyozyten ohne gesteigerte SERCA-Expression nicht schaffen,

## Diskussion

eine normale Kontraktion zu erzeugen. Villegas et al. (2000) bewiesen eine geringere SERCA2 Expression bei Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz.

Die Anfangshypothese in Bezug auf SERCA und NCX konnte nur im Fall von einigen IL-6 Konzentrationen bestätigt werden und es konnte eine relative Zunahme von SERCA gegenüber NCX dargestellt werden. Bei der höchsten untersuchten MCP-1 Menge – 1 µg/ml – drehte sich das Verhältnis SERCA zu NCX sogar zugunsten von NCX um.

Diese Ergebnisse lassen die Vermutung offen, dass hier andere Mechanismen, außer der Veränderung des Verhältnisses von SERCA zu NCX für die Steigerung der kontraktile Funktion verantwortlich sein müssen.

Das Innere der Kardiomyozyte besteht neben den Zellorganellen aus dem Zytoskelett, welches über Transmembranproteine mit der extrazellulären Matrix und damit mit dem restlichen Myokard verbunden ist (Peter et al. 2011). Ein weit verzweigtes Netz an Proteinen ermöglicht der Herzmuskelzelle die Kommunikation mit der extrazellulären Matrix und den benachbarten Zellen. Die Aufnahme mechanischer Reize und deren Übersetzung in biochemische Signale wird Mechanotransduktion genannt; sie führt zu Veränderungen der Zellstruktur und –funktion. Die Mechanotransduktion findet an drei Membranstrukturen statt: 1) dem Sarkomer, 2) dem Sarkolemm und den 3) Glanzstreifen (Lyon et al. 2015). Diese Strukturen modulieren und übersetzen Reize, um sie dann als Signal ins Zellinnere weiterzugeben. Es kommt zur Beeinflussung myokardialer Zellstrukturen und Eigenschaften, zur Fibrose, zur Veränderung der kontraktile Funktion und des Kalzium-Handlings, sowie dem wichtigsten und auf die anderen aufbauenden Effekt: zu Wachstum und Atrophie (Lyon et al. 2015).

Zu den Sarkolemm-medierten Mechanotransduktoren gehören die Integrine. Eines, die Integrin-linked Kinase, spielt eine wichtige Rollen bei Funktionen wie der Kontraktilität (Mao et al. 2013) und dem Wachstum der Kardiomyozyten sowie deren Heilung (Hannigan et al. 2007). Dai et al. (2014) wiesen an Integrin-linked Kinase-knock-out-Mäusen eine starke Reduktion der Herzfunktion durch eine verminderte Verkürzungsfraction nach. Des Weiteren zeigten diese Mäuse einen starken Anstieg inflammatorischer Zellen im Myokard.

Die in dieser Arbeit untersuchten isolierten Kardiomyozyten lagen einzeln vor und waren aus ihrem Zellverband herausgelöst. Zwar wurden durch die Waschungen nicht-anheftende, defekte Zellen entfernt, jedoch muss an dieser Stelle die Frage offen bleiben, wie intakt die Zellmembran tatsächlich war, werden die Membranübergreifenden Strukturen der Mechanotransduktion einbezogen. Diese sind, wie zum Beispiel die Integrin-linked Kinase, in die Zellmembran eingelagert und können dann

die ursprüngliche Funktion – die Aufnahme mechanischer Reize aus der Umgebung und deren Übersetzung in biochemische Signale (Lyon et al. 2015) – nicht mehr gänzlich ausüben. Die Integrin-linked Kinase spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Kontraktilität von Kardiomyozyten, der Hemmung der Kollagensynthese und Fibroblastenproliferation, sowie der Infiltration proinflammatorischer Zellen (Dai et al. 2014; Hannigan et al. 2007; Mao et al. 2013). Die *in vitro* Behandlung von humanen fetalen Kardiomyozyten mit IL-6 führte zur Aktivierung des Integrin-linked-Kinase-Signalweges, so dass wenigstens teilweise die IL-6 Wirkung über dieses Molekül denkbar ist (Lin et al. 2013).

Eine weitere Struktur, welche für die Regulation der kontraktilen Funktion mit verantwortlich ist, ist das Protein S100A1. Es gehört zur Subgruppe der Ca<sup>2+</sup>-Sensor-Proteine innerhalb der EF-hand-Ca<sup>2+</sup>-bindende-Superfamilie und ist ein Kalziumionen-bindendes Protein, welches am sarkoplasmatischen Retikulum und den kontraktilen Filamenten der Kardiomyozyten lokalisiert ist. S100A1 ist damit ein übergeordneter Regulator des Kalzium-Netzwerkes der Kardiomyozyten und konnte als positiv inotroper Regulator der myokardialen Kontraktilität *in vitro* und *vivo* identifiziert werden (Most et al. 2001; Pleger et al. 2005; Rohde et al. 2015). S100A1-überexprimierende Kardiomyozyten zeigten eine signifikante Zunahme des zytosolischen Kalziums mit anschließend gesteigerter Aufnahme des Kalziums ins sarkoplasmatische Retikulum (Most et al. 2001). Verschiedene Studien bewiesen, dass S100A1 in der Lage ist, die Expression pro-inflammatorischer Zytokine (z. B.: TNF-alpha) zu dämpfen (Sen et al. 2014; Yu et al. 2015). Diese Funktion legt nahe, dass eine umgekehrte Funktion – die Induktion und/oder Inhibition von S100A1 durch Zytokine – möglich sein könnte.

Die vorliegende Arbeit wies eine vermehrte Expression von SERCA auf Proteinebene unter Inkubation von IL-6 nach. Die 24 Stunden andauernde Inkubation mit anderen Zytokinen, sowie Kombinationen von Zytokinen führte zu keinem Effekt auf das SERCA/NCX-Verhältnis. Es gibt bisher in der Literatur keine spezifischen Angaben zu den unterschiedlichen Zytokinen und deren Einfluss auf die kontraktile Funktion. Die Bedeutung von S100A1-Proteinen und den unterschiedlichen SERCA-Isoformen gibt aber Hinweise auf die möglicherweise beteiligten alternativen Signalwege.

### **5.5 Western Blot als Methode der Kalziumkanalbestimmung**

Als semiquantitativer Nachweis der Kalziumtauscher SERCA und NCX wurde in dieser Arbeit der Proteinnachweis auf Basis des Western Blots (siehe Kap. 3.3.) durchgeführt. Dazu wurden die Zytokin-inkubierten und vermessenen isolierten Kardiomyozyten so geerntet, dass im Anschluss daran SERCA und NCX auf Proteinebene be-

stimmt werden konnten. Die zu Beginn aufgestellte Hypothese – Anstieg der kontraktiven Funktion durch vermehrte SERCA-Expression – konnte nicht bestätigt werden, wobei neben der oben diskutierten Wirkung auch die gewählte Methode kritisch betrachtet werden muss. Die Präparation der isolierten Kardiomyozyten, sowie deren Verteilung auf die Zellkulturschalen war ein standardisierter Prozess. Trotzdem kam es zu Variationen in der Anzahl der ausplattierten Kardiomyozyten je Zellkulturschale. Um die unterschiedliche Anzahl der Kardiomyozyten als Unsicherheitsfaktor auszugleichen, wurden alle ermittelten Werte auf  $\beta$ -Aktin normiert. Trotzdem variierten die gemessenen arbitrary units (Einheit der Schwärzung der Membran) von SERCA und NCX, im Vergleich zum housekeeping-Protein  $\beta$ -Aktin, innerhalb einer Versuchsbedingung aber bei unterschiedlichen Präparationen teils erheblich.

Des Weiteren könnten bei der Blotting-Technik des Proteinbestimmungsverfahrens ein nicht effizienter Transfer und eine nicht effiziente Bindung der Proteine an die Membran ein diese Technik überschattendes Problem gewesen sein. Auch könnten bei diesem Prozess Proteine zerstört oder verloren gehen oder aber nicht richtig an die Membran gebunden worden sein (Westermeier and Marouga 2005). Durch die, in dieser Methode vorliegende weite Streuung der Ergebnisse, lässt sich die Aussagekraft der Bestimmung des SERCA/NCX-Verhältnisses unter Umständen als fehlerhaft einstufen und muss bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Ein weiterer kritischer Aspekt stellt die Bestimmung der Proteine nach der durchgeführten elektrisch stimulierten Kontraktionsmessung dar. Dies wurde in dieser Form durchgeführt, da eine unabhängige Bestimmung der kontraktiven Funktion und Proteinexpression zur Verdopplung der Tierzahlen geführt hätte. Um dennoch diesen Unsicherheitsfaktor weitestgehend auszuschließen, wurden zuvor beispielhaft Kardiomyozyten mit Zytokinen stimuliert und das SERCA/NCX Verhältnis ohne vorherige elektrische Stimulation bestimmt. Die gewonnenen Ergebnisse waren vergleichbar.

### **5.6 Zytokinwirkung auf isolierte Kardiomyozyten hypertensiver Ratten**

In der Literatur wird immer wieder beschrieben, dass Zytokine im Zusammenhang mit fortschreitenden Erkrankungen vermehrt im Plasma zu finden sind. Um die Frage zu klären, ob der Erkrankungsgrad einen Einfluss auf Zytokinwirkungen hat, wurden neben normotensiven Kardiomyozyten auch hypertensive Kardiomyozyten untersucht. Einzelne Zytokine wurden daher in drei unterschiedlichen Konzentrationen auf ihre Kontraktions-modulierenden Eigenschaften an Kardiomyozyten von SHR getestet. Zwischen nativen normo- und hypertensiven Kardiomyozyten zeigten sich keine Unterschiede bei der basalen kontraktiven Funktion. Bei SHR Kardiomyozyten führte die

## Diskussion

Konzentration von 1 ng/ml IL-6 zur signifikanten Steigerung der kontraktilen Funktion, wohingegen die höheren Konzentrationen keinen Effekt erzielten. Das war widersprüchlich zu den Ergebnissen, gewonnen mit Kardiomyozyten aus normotensiven Tieren, bei welchen die höheren IL-6 Konzentrationen zu gesteigerten Effekten führten. Weiter ließ sich eine signifikante Zunahme der kontraktilen Funktion beim Zusatz von 10 ng/ml TIMP-1 nachweisen. Alle anderen zugesetzten Zytokine, bzw. Konzentrationen führten zu keiner signifikanten Steigerung der kontraktilen Funktion.

Die Hypertension der SHRs ist polygenetischen Ursprungs und die Tiere entwickeln im Alter von 7-15 Wochen einen spontanen Bluthochdruck und mit 18-24 Monaten eine Herzinsuffizienz (Bing et al. 2002; Boluyt et al. 1995; Janvier Labs), welche bei den hier verwendeten 16 Wochen alten Tieren noch nicht vollständig ausgeprägt war. Ist die Herzinsuffizienz hingegen voll ausgeprägt, zeigen die Tiere eine verminderte myokardiale Kontraktilität und zunehmende linksventrikuläre Hypertrophie (Boluyt et al. 1995; Carlsen et al. 1996). Boluyt et al. (1995) untersuchten die Kardiomyozyten im Papillarmuskel hypertensiver Tiere und erreichten bei SHR mit und ohne Herzinsuffizienz unter Zugabe von Isoprenalin (Sympathikomimetikum) keine und teils negativ inotrope Effekte. Sie führten dies auf die altersabhängige Änderung bei der beta-Rezeptorendynamik zurück. Carlsen et al. (1996) wiesen im Skelettmuskel von SHR erhöhte Natrium-Permeabilität und reduzierte Natrium-Kalium-Austauscher-Kapazität nach, was zur schnelleren Ermüdung des Muskels führte, ein Effekt, der sich durch Gabe von Kalzium-Kanalblockern aufheben ließ. Die Reduktion des NCX an der Zellmembran führte zu veränderter Kalziumfreisetzung und spielte eine wichtige Rolle bei der Entwicklung kontraktile Defizite hypertensiver Muskeln (Carlsen et al. 1996).

Miguel-Carrasco et al. (2010) untersuchten die Plasma-Konzentrationen von IL-6 bei SHR und fanden um 34% erhöhte Konzentrationen gegenüber den normotensiven Wistar-Kontroll-Tieren (Romero-Vasquez et al. 2012). Eine andere Studie zog aus ähnlichen Ergebnissen den Schluss, dass IL-6 an der Entstehung einer Herzinsuffizienz bei SHR beteiligt sein muss (Haugen et al. 2007). Eine mögliche Ursache der gesteigerten kontraktilen Funktion isolierter Kardiomyozyten hypertensiver Ratten bei einer geringeren IL-6 Konzentration, im Vergleich zu Kardiomyozyten normotensiver Ratten, könnte im sogenannten Priming gelegen haben. Als Priming wird eine schnellere oder veränderte Verarbeitung von Reizen bezeichnet, die ein zweites Mal dargeboten werden (Schneider and Fink 2013). Wenn also SHR eine bereits zu Lebenszeiten erhöhte IL-6 Konzentration aufweisen, wäre es über diesen Weg zu erklären, dass schon eine geringere IL-6 Konzentration bereits eine Steigerung der kontraktilen Funktion isolierter Kardiomyozyten zur Folge hat. Bei der Wirkung von IL-6 auf neu-

## Diskussion

trophile Granulozyten ist diese Wirkung bekannt. Hier führt IL-6 zur überspitzten Zytotoxizität neutrophiler Granulozyten durch Priming, und auch Murakami et al. (2012) kommen zu dem Ergebnis, dass IL-6 eine verstärkte Chemokin-Induktion zur Folge hat (Biffi et al. 1994). Allerdings ist dieser Mechanismus lediglich in diesen beiden Arbeiten beschrieben und die Literaturrecherche führte zu keinen Hinweisen auf mögliche IL-6 Wirkungsmechanismen bei SHR, auch nicht, ob diese im Vergleich zu normotensiven Tieren, verändert sein könnten.

TIMP-1 erhöhte als zweiter Mediator ebenfalls die kontraktile Funktion isolierter hypertensiver Kardiomyozyten bei der Konzentration von 10 ng/ml. Eine systemische Hypertension mündet im Lauf der Zeit häufig in einer Herzerkrankung; die Korrelation dieser Problematik mit vorliegenden TIMP-1 Konzentrationen wurde in vielen Studien untersucht und in einen positiven Zusammenhang gebracht (Collier et al. 2011; Foronjy et al. 2008; Hansson et al. 2009; Lindsay et al. 2002). Tayebjee et al. (2004) untersuchten Patienten mit Hypertension und schrieben TIMP-1 daraufhin eine Schlüsselrolle bei der Induktion der linksventrikulären diastolischen Dysfunktion durch Modulation der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix zu. Sowohl diese Arbeitsgruppe Tayebjee et al. (2004) als auch Kang et al. (2008) kamen zu einem vergleichbaren Ergebnis. Collier et al. (2011) untersuchten die TIMP-1 Konzentration, stellten dieselbe These auf und sind der Überzeugung, durch Überwachung der TIMP-1 Konzentration eine Herzerkrankung früher detektieren und behandeln zu können. Bei herzinsuffizienten SHR konnten Li et al. (2000) eine gesteigerte TIMP-1 Expression im linken Ventrikel feststellen. Bisher gab es keine Untersuchungen zur TIMP-1 Wirkung auf die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten. Die Beschreibung von TIMP-1 als Gegenspieler von MMP-9 in der Literatur bezieht sich vor allem auf die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, bei welcher es eine entscheidende Rolle einnimmt (Hansson et al. 2009). Es fördert unter anderem die Bildung von Typ-1-Kollagen und trägt so zum „Remodeling“ des Herzens bei (Tayebjee et al. 2004). Eine veränderte Zusammensetzung des intrazellulären kontraktilen Apparates durch TIMP-1 ist denkbar, aber wie auch bei IL-6, sind bei TIMP-1 keine Wirkungsmechanismen in der Literatur beschrieben.

Insgesamt muss an dieser Stelle gesagt sein, dass die Datenlage zur Wirkung der einzelnen Zytokine auf das insuffiziente Herz hypertensiver Menschen oder Ratten gering ist, so dass weitere Hypothesen aktuell eher spekulativer Natur sind.

Das in dieser Arbeit ebenfalls untersuchte, jedoch nicht dargestellte SERCA/NCX-Proteinverhältnis führte zu keiner kausalen Erklärung der kontraktilitätssteigernden Wirkung von IL-6 und TIMP-1 bei SHR.

Zum Abschluss muss auch das Model der spontan hypertensiven Ratten kritisch betrachtet werden. So sind diese Tiere hyperaktiv, insulinresistent und entwickeln im Alter von 7-15 Wochen eine spontane Hypertension, deren Ursprung polygenetisch ist (Janvier Labs). Das Model der SHR spiegelt einen Subtyp des humanen Hypertoni- kers wider. Wie auch bei Menschen entwickeln nicht alle hypertonen Tiere schwere Organschäden, was auf Bewältigungsstrategien des Organismus hindeutet, die in Studien berücksichtigt werden müssen (Pinto et al. 1998).

### **5.7 Vergleichbarkeit isolierte Kardiomyozyten und Myokardkontraktilität**

Ein Großteil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Wirkung einzelner und in Kombina- tion eingesetzter Zytokine auf isolierte Kardiomyozyten der Ratte, welche sich, durch elektrische Stimulation angeregt, entsprechend der eingestellten Frequenz kontrahier- ten. Der Vorteil der isolierten Kardiomyozyten in dieser Arbeit besteht in der homoge- nen Population von Einzelzellen, die einfach darzustellen und zu manipulieren sind, so dass die Wirkung jedes einzelnen Zytokins isoliert betrachtet werden kann (Mitcheson et al. 1998).

Die Bedingungen der einzelnen Messungen sind bei dieser Methode untereinander konstant und es ist möglich, viele Zellen - bei verhältnismäßig geringen Tierzahlen - in einem engen Zeitraum zu vermessen. Näher am Modell wäre eine Betrachtung der Wirkung auf das Herz *in toto*, zum Beispiel im Langendorff-Apparat oder aber *in vivo*. Allerdings wäre bei einer *in vivo* Messung eine isolierte Betrachtung einzelner Zytoki- ne schwierig, da die Vielzahl der im Herz vorkommenden Zellen Zytokine sezernieren dürften. Obwohl die isolierte und sehr standardisierte Betrachtung einzelner Zellen viele Vorteile bietet, muss an dieser Stelle ein kritischer Blick auf das Modell der iso- lierten Kardiomyozyten geworfen werden.

Bei der Methode der frisch isolierten Kardiomyozyten, mit der Ratte als Spendertier, sollte die Übertragung auf die Zustände des intakten Herzens *in vivo* und vor allem in anderen Spezies nicht leichtfertig durchgeführt werden (Mitcheson et al. 1998). So ist die Funktion des Herzens von Natur aus bei den einzelnen Spezies unterschiedlich. Ob und wie diese Unterschiede die Übertragbarkeit vom Nagetier auf den Menschen und andere Spezies limitieren, hängt speziell vom untersuchten Prozess ab (Milani- Nejad and Janssen 2014). Die Tiere werden vor der Tötung mittels Isofluran betäubt. Joho et al. wiesen bereits 2007 eine negative Wirkung des Anästhetikums Isofluran auf die Kontraktilität der isolierten Kardiomyozyten nach. Weiterhin wurde dem Kul- turmedium FCS zugesetzt, ein komplexes biologisches Gemisch, welches bekannt dafür ist, von Charge zu Charge stark an Inhaltsstoffen zu variieren. Es enthält viele

Wachstumsfaktoren und wenig Wachstumsinhibitoren, ein Umstand, der nicht unerheblichen Einfluss auf die gewonnenen Ergebnisse haben kann (Mannello and Tonti 2007). Die Methode der enzymatischen Verdauung des Herzens bewirkt, dass Kardiomyozyten aus ihrem Zellverband herausgelöst werden, so dass sie einzeln vorliegen. Ihnen fehlt so jedoch der physiologische Zusammenhalt untereinander über Glanzstreifen und über die extrazelluläre Matrix (Mitcheson et al. 1998); organisierte Sarkomere und T-Tubuli werden teilweise zerstört (Roth et al. 2014). Die Kardiomyozyten sind wohl aber in Lage während des Prozesses der enzymatischen Aufschlüsselung den Zellschaden an ihrer Membran begrenzt zu reparieren (Piper 1990). Die Kontraktion der einzelnen Zellen verläuft, im Gegensatz zur Zelle im Zellverband, lastfrei. Es ist davon auszugehen, dass eine Kardiomyozyte im Zellverband geringere prozentuale Zunahmen der kontraktile Funktion erreicht, als eine isolierte Kardiomyozyte.

Je höher die Frequenz, mit der die isolierten Kardiomyozyten stimuliert wurden, desto weniger deutlich sind die unterschiedlichen Effekte. Die Ratte hat eine physiologische Herzfrequenz von 250-460 Kontraktionen pro Minute (Gabrisch and Zwart 2005); bei der Stimulation der isolierten Kardiomyozyten werden 0,5, 1 und 2 Hz eingestellt, was den Frequenzen 30, 60 und 120 Kontraktionen pro Minute entspricht. Milani-Nejad und Janssen (2014) trugen Daten zusammen, welche die unterschiedlichen Kontraktionskinetiken der Kardiomyozyten von Ratte, Maus und Mensch bei einer Frequenz von 2 Hz deutlich machten. Größere Tiermodelle schienen sich für kinetische Fragestellungen der Herzfunktion besser zu eignen (Milani-Nejad and Janssen 2014). Wurde die hier eingesetzte Methode der Isolierung bei Hundeherzen durchgeführt, so lag die Vergleichbarkeit zu bekannter Kontraktilität *in vivo* mit einer Sensitivität von 81% und einer Spezifität von 75% relativ hoch (Harmer et al. 2012).

Trotz dieses Kritikpunktes wird das Modell der Stimulation isolierter Kardiomyozyten aus Ratten seit vielen Jahrzehnten in unterschiedlichen Bereichen der Forschung als Modell des adulten Myokards eingesetzt und hat viel zum Verständnis der Prozesse in und an den Kardiomyozyten (Mitcheson et al. 1998) beigetragen.

### **5.8 Progenitorzellkulturen**

Das Herz galt lange als terminal differenziertes Organ, welches auf steigende Anforderungen nur durch erhöhte Arbeit und Kompensation in Form von Hypertrophie antworten konnte (Messina et al. 2004). In den letzten Jahren haben unterschiedliche Arbeitsgruppen diese Hypothese in Frage stellen können (Bearzi et al. 2007; Beltrami et al. 2001; Bergmann et al. 2009; Chimenti et al. 2010; Davis et al. 2010 u.a.). Berg-

## Diskussion

mann et al. (2009) wiesen mittels  $^{14}\text{C}$ -Methode sogar eine Erneuerung von bis zu 50% aller Kardiomyozyten im Laufe des Lebens nach, nachdem viele Jahre die Regeln der Zellalterung und –erneuerung auf das Herz nicht angewendet wurden (Leri et al. 2015).

CPCs sind konstitutiv im Herzen nachweisbare, noch differenzierungsfähige Zellen, welche *ex vivo* in schlagende, kardiomyozytenähnliche Zellen differenzieren können (Messina et al. 2004). Charakterisiert sind diese CPCs durch ihre Stammzellmarker c-kit, sca-1 oder islet-1 (Krehbiel 2010; Müller 2010). Bearzi et al. (2007) beschrieben die Differenzierung der c-kit-positiven Zellen in Kardiomyozyten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen. Neueste Studien bezweifeln allerdings, dass c-kit als Marker tatsächlich rein stammzellspezifisch ist (Keith and Bolli 2015). Die Progenitorzellen setzen lösliche Faktoren wie Wachstumsfaktoren und Zytokine frei (Gnecchi et al. 2005; Maxeiner et al. 2010). Die bisher nachgewiesene Wirkung der sogenannten „Stammzelltherapie“ resultierte aus der parakrinen Wirkung der von den Progenitorzellen freigesetzten Stoffe, die über mehrere Mechanismen funktionieren: die humorale Stimulation der endogenen Regeneration, die Erhaltung der bereits existierenden Zellen und die Neovaskularisation (Chimenti et al. 2010; Huang et al. 2014; Jezierska-Wozniak et al. 2011; Liu et al. 2014). Konträr hierzu zeigen präklinische Studien heute kein einheitliches und eher bescheidenes Ergebnis der „Stammzelltherapie“ bei Herzerkrankungen (Nunez Garcia et al. 2015). Eine deutlich positivere Wirkung kann hingegen *in vitro* nachgewiesen werden (Chimenti et al. 2010). Bei der Kultivierung der Progenitorzellen wurde in der vorliegenden Arbeit nach dem Protokoll von Messina et al. (2004) vorgegangen. Dabei wurde humanes, kardiales Gewebe gewonnen und durch zwei Kulturphasen passagiert, um die sogenannten „phase-bright cells“ oder auch „Kardiosphären“ zu erhalten. In der vorliegenden Arbeit interessierten bei weiteren Untersuchungen deren Überstände und die dahinein sezernierten Zytokine.

Trotz des Einsatzes des „cardiosphere-growing“ Mediums “ (hier als „Medium nach Trypsinieren“ genannt) (Messina et al. 2004) blieben die Zellkulturen Mischkulturen. Als Grundlage der untersuchten Kulturen diente atriales und ventrikuläres Gewebe, welches neben den Progenitorzellen, auch Kardiomyozyten, glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Gewebsmakrophagen beherbergt (Scheufen 2012). Die Freisetzung der Zytokine erfolgte stark gesteigert in der zweiten Phase der Kultur mit dem „cardiosphere-growing“ Medium (Krehbiel 2010). Im Ergebnisteil 4.11. wurde die Bestimmung der IL-6 Konzentration im Überstand beschrieben. Deutlich wird dabei, dass diese sehr hohe IL-6 Konzentration weder im Medium noch in den Überständen vor der Trypsinierung vorhanden war und somit während der gezielten Kulti-

## Diskussion

vierung der Kardiosphären im „cardiosphere-growing“ Medium“ gebildet wurde (Messina et al. 2004). Allerdings existieren auch in dieser Phase der Kultivierung noch Zellen mit kardiomyozyten-, endothel-, und fibroblastenartigen Eigenschaften (Messina et al. 2004; Beltrami et al. 2003). Da Fibroblasten- und Endothelzellkulturen kein IL-6 freisetzen, (Maxeiner et al. 2014) könnte daraus geschlossen werden, dass die erhöhte IL-6 Produktion von den Progenitorzellen bzw. Kardiosphären ausgeht. Welchem Zweck diese Faktoren *in vivo* dienen, muss weiteren Untersuchungen überlassen bleiben.

Die Untersuchungen der einzelnen Zytokine, von denen bekannt ist, dass sie von Progenitorzellen freigesetzt werden, lässt vermuten, dass diese – vor allem IL-6 – eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Funktionstüchtigkeit des Herzens im Falle einer Erkrankung spielen (Krehbiel 2010, Maxeiner et al. 2010).

Um die Bedeutung der einzelnen Zytokine für die Progenitorzellkultur an sich und für ihre eigene Freisetzung zu untersuchen, wurden murine CPC Kulturen in der Endphase der Kultivierung mit den unterschiedlichen Zytokinen stimuliert. Dazu wurden CPC-Kulturen von normotensiven und hypertensiven Ratten angelegt, dem Differenzierungsmedium der einzelnen CPC-Zellkulturschalen jeweils exemplarisch 1 ng/ml IL-6, 1 ng IL-8 oder 100 ng/ml MCP-1 zugesetzt und diese Konzentrationen während der gesamten Kultivierungsphase aufrecht erhalten. Da freigesetzte Zytokine im Überstand natürlich auch auf die CPC-Kulturen selbst wirken, stellt sich die Frage, ob eine autokrine Wirkung eintritt und ob es zum Beispiel zu einem schnelleren Wachstum der CPC-Kulturen kommt. Außerdem sollte untersucht werden, ob dieser veränderte Zytokin-Cocktail wiederum das Kontraktionsverhalten isolierter Kardiomyozyten verändert.

Bei der visuellen Kontrolle des Wachstums konnte kein beschleunigtes oder verändertes Wachstum festgestellt werden. Die Überstände dieser CPC-Kulturen wurden im Anschluss über 24 Stunden auf isolierte Kardiomyozyten gegeben. Hierbei führten die Überstände der normotensiven CPC-Kulturen zu einer mittelgradigen Zunahme der kontraktilen Funktion. Die vergleichbaren humanen CPC-Kulturen wurden von herzkranken Menschen gewonnen, so dass davon auszugehen ist, dass die Progenitorzellen dort bereits *in vivo* regenerative Prozesse in Gang gebracht und noch andere Zytokine und Wachstumsfaktoren ins Medium sezerniert haben dürften. Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass der kardiovaskuläre Status des CPC-Gewebe-Spenders Einfluss auf isolierte Kardiomyozyten hat. Auch zeigte sich, dass CPC-Kulturen, welche hypoxisch präkonditioniert wurden, später einen deutlich geringeren Sauerstoff-Verbrauch hatten. Die Zellen erkrankter Patienten waren durch die jeweils

vorliegenden Erkrankungen und deren Folgen (zum Beispiel Hypoxie, Hypertonie, vermehrte Zytokinausschüttung) präkonditioniert, während die Zellen gesunder adulter Ratten dieses nicht waren (Maxeiner et al. 2014, Tan et al. 2015). Wurden CPCs aus Wistar-Ratten mit IL-6 inkubiert, so konnte eine weitere Steigerung der kontraktilen Funktion hervorgerufen werden. Die hypertonen CPC-Kulturen führten zur Steigerung der kontraktilen Funktion auf bis zu 10% gegenüber den Kontrollzellen. Diese Effekte waren vergleichbar mit den Ergebnissen der vorangegangenen Studien mit humanen hypertonen CPC-Kulturen. Die deutliche Zunahme der kontraktilen Funktion nach Inkubation der CPC-Kulturen mit IL-6 unterstreicht die oben bereits aufgeführte herausragende Wirkung von IL-6 auf die kontraktile Funktion isolierter Kardiomyozyten. Des Weiteren bekräftigte diese Arbeit die Hypothese, dass der Status des CPC-Spenders ausschlaggebend ist für die erzielten parkrinen Effekte (Maxeiner et al. 2014).

### **5.9 Inhibition der Expression von IL-6 in den Progenitorzellkulturen**

Dieser Arbeit vorangegangene Versuche untersuchten die Effekte konditionierter Überstände auf die kontraktile Funktion isolierter Kardiomyozyten (Maxeiner et al. 2014; Krehbiehl 2010). Dabei wiesen diese nach der Inkubation mit den Überständen signifikant gesteigerte kontraktile Funktionen auf. In den hier durchgeführten Untersuchungen stellte sich IL-6 als eines der potentesten Zytokine in Bezug auf die Beeinflussung der kontraktilen Funktion isolierter Kardiomyozyten der Ratte heraus. Aus diesem Grund sollte nun IL-6 durch Zugabe von siRNA inhibiert werden, um herauszufinden, ob die Effekte auf dieses Zytokin zurückzuführen sind. Dazu kam zuerst das von der Firma Qiagen vorgegebene Protokoll zum Einsatz, bei welchem eine siRNA-Konzentration von 5 nM und drei verschiedene Konzentrationen an HiPerFect® vorgegeben wurden. Im ELISA konnte gezeigt werden, dass diese siRNA-Menge nicht ausreichte, um die IL-6 Expression zu reduzieren.

Nach Rücksprache mit der Firma wurde das Protokoll beibehalten, die siRNA Konzentrationen aber bedeutend gesteigert. So kamen 25, 50 und 75 nM siRNA bei 4,5 µl HiPerFect® zum Einsatz. Bei diesen ansteigend hohen Konzentrationen kam es zu einer zunehmend hemmenden Tendenz der IL-6 Expression, allerdings inhibierte keine Konzentration die Expression signifikant auf einen Nullwert. Werden hohe siRNA-Konzentrationen eingesetzt, können sogenannte „Off-Target“ Effekte auftreten (Qiagen GmbH; Krueger et al. 2007), welche die Ergebnisse maßgeblich beeinflussen können.

Des Weiteren sind die Transfektionsverfahren zwar für die meisten Zelltypen entwickelt und verfeinert worden, die Ausbeute bei Vorläuferzellkulturen ist jedoch häufig

## Diskussion

gering und es kann zum Zelltod einer Mehrzahl der Zellen kommen (Schmitz 2005, Aussage der Firma Qiagen 2014). Bei sich kontinuierlich teilenden Zellen, wie in den vorliegenden Untersuchungen, können Mutationen und alternatives Spleißen zu Variationen der Zielsequenz führen, so dass es zu einer Abweichung der Sequenz von der tatsächlichen Transkriptionssequenz kommt (Qiagen GmbH). Dass die Transfektion von CPC-Kulturen mit siRNA grundsätzlich funktioniert, wird deutlich in den von Liu et al. (2014) durchgeführten Experimenten: die Arbeitsgruppe untersuchte die Expression des Junctional adhesion molecule-A in CPC-Kulturen und konnte sie durch den siRNA-Einsatz erfolgreich hemmen.

Die CPC-Kulturen dieser Arbeit wurden nach einer Kultivierungsphase von vier Wochen trypsinisiert und dann weitere acht Tage mit „cardiosphere-growing medium“ („Waschmedium nach Trypsinieren“) kultiviert. Am Tag acht und elf nach dem Trypsinieren erfolgte die Transfektion mit siRNA, am Tag 13 die Isolation. Dies entsprach sowohl den Angaben von Qiagen als auch den anderer Arbeitsgruppen, welche ebenfalls einen Isolationszeitraum von drei Tagen nach der Transfektion gewählt haben (Liu et al. 2014; Krueger et al. 2007). Das Protokoll der zweimaligen Transfektion wurde ausgesucht, so dass mögliche parakrine Effekte von IL-6 auf die *in vitro* wachsenden Zellen reduziert werden. Mikroskopisch ließ sich kein verändertes (z. B. langsames) Wachstum der nicht-transfizierten Kontrollzellen im Vergleich zu den hochkonzentriert transfizierten Zellen feststellen.

IL-6 ist ein sehr kurz wirksames Zytokin, das bereits kurze Zeit nach einem Insult exprimiert wird, was bedeutet, dass eine hohe IL-6 Umsatzrate vorliegen muss. Möglicherweise ist die vermeintlich fehlende IL-6 Inhibition durch eine spezifische siRNA mit diesem Phänomen zu erklären. Durch die kurze Wirksamkeit von IL-6 muss es in kurzer Zeit nachgebildet werden, um bestimmte Konzentrationen aufrecht erhalten zu können. Diese hohe Umsatzrate führt zur vermehrten Transkription und Bildung von IL-6 mRNA, welche dann im Zytoplasma durch die siRNA gebunden und eliminiert wird (Gwechenberger et al. 1999; Kobara et al. 2010; Schneider 2014). Dieser Umstand könnte erklären, wieso es nur zu einer partiellen Hemmung der IL-6 Expression gekommen ist. Vorstellbar wäre ein zu großer zeitlicher Abstand zwischen den einzelnen Transfektionen, oder der Zeitpunkt der Isolation lag zu weit von der Transfektion entfernt, so dass die siRNA bereits aufgebraucht und erneute IL-6 mRNA gebildet wurde. Aufgrund dieser nicht geklärten Umstände ist eine Aussage über die fehlende komplette Herabregulation der IL-6 Expression nur schwer möglich. Einen Hinweis auf die Bedeutung von IL-6 zeigt sich aber erneut bei der weiterhin gesteigerten kontrakti-

## Diskussion

len Funktion isolierter Kardiomyozyten nach Stimulation mit diesen Überständen (Abb. 39).

### 6 Zusammenfassung

**Einleitung:** Herz-Kreislaufkrankungen gehören zu den häufigsten Erkrankungen der Bevölkerung in den Industrienationen und Ihre Bedeutung in der Tiermedizin bezüglich Diagnose und Behandlungen wird immer wichtiger. Die Erforschung neuer Therapieoptionen hat einen hohen Stellenwert in der nationalen und internationalen Forschung. Im letzten Jahrzehnt wurden kardiale Progenitorzellen (oder auch adulte Stammzellen) entdeckt und die Forschung musste das lang vorherrschende Dogma, das Herz sei ein terminal differenziertes Organ, in Frage stellen. Die ursprüngliche Annahme, dass diese Zellen einen direkten Zellersatz bewirken ist mittlerweile widerlegt. Vielmehr konnte in vielen Studien bewiesen werden, dass sie ihre Wirkung durch autokrine, parakrine und endokrine Mechanismen vermitteln. Durch die Bildung einer Vielzahl an Mediatoren sind Progenitorzellen in der Lage, die sie umgebenden Zellen zu beeinflussen.

Im Zuge der Erforschung dieser Vorläuferzellen wurde deren Kultivierung in sogenannten kardialen Progenitorzellkulturen (CPC-Kulturen) möglich gemacht. In dieser Arbeit vorangegangenen Untersuchungen konnten in den „konditionierten“ Überständen eine Reihe von Zytokinen in besonders hohen Konzentrationen detektiert werden. Diese waren die Zytokine Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), growth differentiation factor-15 (GDF-15) und der Faktor tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1). Diese 5 Mediatoren wurden in dieser Arbeit auf Ihre Kontraktions-modulierenden Eigenschaften hin untersucht.

**Ergebnisse:** Um dies zu untersuchen wurden Kardiomyozyten zum einen von normotensiven Wistar-Ratten und zum anderen von hypertensiven SH-Ratten gewonnen. Diese wurden über 24 Stunden mit den jeweiligen Mediatoren inkubiert und anschließend im elektrischen Feld stimuliert. Wichtigster Parameter der Messung der kontraktilen Funktion war die Differenz der diastolischen und systolischen Zelllänge in Prozent ( $\Delta L/L\%$ ); die fraktionelle Zellverkürzung. vier der fünf untersuchten Mediatoren zeigten einen positiven Effekt auf die kontraktilen Eigenschaften isolierter Kardiomyozyten. Lediglich GDF-15 beeinflusste in allen getesteten Konzentrationen nicht die fraktionelle Zellverkürzung. Die genannten Effekte waren besonders prominent ausgeprägt bei isolierten Kardiomyozyten normotensiver Ratten, während Kardiomyozy-

## Zusammenfassung

ten hypertensiver Ratten (SHR) deutlich weniger sensibel auf die applizierten Zytokine reagierten.

Die aufgestellte Hypothese, die Ursache der gesteigerten kontraktilen Funktion sei in der veränderten Zusammensetzung der Kalziumtransporter SERCA und NCX zu finden, ließ sich auf Proteinebene nur für IL-6 bestätigen.

Unter den fünf untersuchten Zytokinen erwies sich IL-6 als besonders interessant. Neben den signifikanten Effekten bei der Einzelapplikation, erwiesen sich Zytokin-Kombinationen mit IL-6 stets als steigernd auf die kontraktile Funktion. Durch den Einsatz spezifischer IL-6 Antikörper konnte die besondere Stellung von IL-6 in diesem Kontext bewiesen werden.

Ein alternativer Ansatz zur Reduktion der IL-6 Wirkung in konditionierten Überständen, lag im Einsatz spezifischer siRNAs gegen IL-6. Es konnte zwar eine Reduktion der IL-6 Freisetzung erzielt werden, eine komplette Reduktion war jedoch nicht möglich. Folgerichtig bewirkten diese konditionierten Überstände auch weiterhin eine Steigerung der kontraktilen Funktion.

Die Supplementierung der Zytokine zu den CPC-Kulturen selbst - im Sinne einer autokrinen Wirkung - veränderte nicht die Kontraktions-steigernden Eigenschaften der gewonnenen konditionierten Medien.

**Schlussfolgerung:** Vorläuferzellen beeinflussen ihre Umgebung durch die Freisetzung einer Vielzahl von Mediatoren. Um deren Wirkung zu verstehen, ist die Betrachtung einzelner Faktoren notwendig. Diese Arbeit fokussierte auf die Beeinflussung der kontraktilen Funktion isolierter Kardiomyozyten. Es konnte gezeigt werden, dass diese Funktion von einigen Zytokinen besonders stark positiv beeinflusst wird.

Die Erhaltung der Funktionsfähigkeit von Kardiomyozyten ist Voraussetzung für das Überleben des Organs und damit des Organismus. Unterschiedliche Erkrankungen gehen aber mit einem Untergang von Herzmuskelgewebe einher. Das Herz ist – je nach Ausmaß des Schadens – in der Lage, diesen Schaden zu kompensieren. Die im Herzen ansässigen Progenitorzellen sorgen mit der Freisetzung eines Zytokin-Cocktails und dessen parakriner Wirkung dafür, dass die gesunden Kardiomyozyten die Funktion der geschädigten Zellen kompensieren und damit die Funktion des Organs *in toto* aufrechterhalten.

Die darüber hinausgehende Bedeutung von Vorläuferzellen im Zuge des kardialen Remodelings muss weiteren Untersuchungen überlassen bleiben.

### 7 Summary

Cardiovascular diseases are the most common diseases among humans in industrial countries.

The collaboration between basic and clinical research has led to a dramatic increase in knowledge, which makes more effective therapies for heart disease possible. During last decade cardiac progenitor cells (or adult stem cells) were discovered, which led research to question the prevailing dogma whether the heart was a terminally differentiated organ. Currently subject of many studies is the function and mechanisms of cardiac progenitor cells. Today we know without controversy that they mediate their effects through autocrine, paracrine and endocrine mechanisms. Through the production of mediators, progenitor cells are capable to influence their environment.

While researching progenitor cells their cultivation was made possible in so-called cardiac progenitor cell cultures (CPC-Culture). Further studies found out, that these CPCs secrete substances into the medium. The examination of these conditioned supernatants detected a number of cytokines in very high concentrations. These were Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), growth differentiation factor-15 (GDF-15) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1). The present study examines these cytokines in detail and focuses on their effect on the contractile function of isolated cardiomyocytes.

Cardiomyocytes of normotensive Wistar-rats and hypertensive SH-rats were extracted. The cardiomyocytes were incubated with the respective cytokine for 24 hours, followed by stimulation in an electric field. The most important parameter of contractile function is the difference between the diastolic and systolic cell length in percent ( $\Delta L/L\%$ ); the fractional cell shortening. The dose-response-curve of all different cytokines, concentrations and combinations showed positive effects on the contractile function, except for GDF-15. This effect was particularly evident in isolated cardiomyocytes of normotensive rats, whereas isolated cardiomyocytes of hypertensive rats (SHR) reacted significantly less sensitive to the cytokines.

Our assumption that the cause of the increased contractile function would be found in the altered composition of calcium transporter SERCA and NCX was confirmed on protein level only for IL-6. Among the five examined cytokines IL-6 proved to be particularly interesting, because of its well studied effects as a proinflammatory cardiac cytokine. Not only concentrations of 10 ng/ml, 100 ng/ml and 1  $\mu\text{g/ml}$  IL-6 had significant effect on contractile function, cytokine combinations with IL-6 as well always in-

## Summary

creased contractile function. Using specific IL-6 antibodies proved that IL-6 as a cytokine has positive effects on the contractile function.

Treatment of CPC-culture from rats with cytokines and subsequent incubation of isolated cardiomyocytes with the supernatants of these cells had no effect on contractile function. To investigate the effect of conditioned supernatants without IL-6 on isolated cardiomyocytes, an attempt was made by blocking IL-6 expression with specific siRNA. Although it was able to reduce IL-6 expression, it was not possible to turn it off completely and high IL-6 concentrations remained in the supernatant. As expected using this supernatant on isolated cardiomyocytes showed a significant increase in the contractile function - which individual measurements of IL-6 had already demonstrated.

### Conclusion:

CPCs release a variety of cytokines. Close inspection of the individual cytokine is necessary to understand their effects. This study focuses on the manipulation of contractile function of isolated cardiomyocytes. It showed that some cytokines have a strong positive effect on the contractile function.

Maintaining functioning cardiomyocytes is imperative for the survival of the organ and thus the organism. Some diseases lead to a decline of myocardial tissue. To a certain extent the heart can compensate damage. Presumably progenitor cells of the heart secrete a cytokine-cocktail that has a paracrine effect on adjacent cardiomyocytes. These healthy cardiomyocytes then compensate the function of the damaged cardiomyocytes and thus preserve the function of the whole organ.

Beside the investigated cytokines, CPCs secrete many other mediators into the environment. To what extent they influence the function and regeneration of the diseased heart future research will have to show.

## 8 Literaturverzeichnis

- Abe, Y., Kawakami, M., Kuroki, M., Yamamoto, T., Fujii, M., Kobayashi, H., Yaginuma, T., Kashii, A., Saito, M. and Matsushima, K.** (1993). Transient rise in serum interleukin-8 concentration during acute myocardial infarction. *Br Heart J* **70**, 132–134.
- Amado, L., Saliaris, A., Schuleri, K., St John, M., Xie, J., Cattaneo, S., Durand, D., Fitton, T., Kuang, J., Stewart, G.** (2005). Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 11474–11479.
- Anwar, A., Schluter, K.-D., Heger, J., Piper, H. M. and Euler, G.** (2008). Enhanced SERCA2A expression improves contractile performance of ventricular cardiomyocytes of rat under adrenergic stimulation. *Pflugers Arch* **457**, 485–491.
- Arakelyan, A., Petrakova, J., Hermanova, Z., Boyajyan, A., Lukl, J. and Petrek, M.** (2005). Serum levels of the MCP-1 chemokine in patients with ischemic stroke and myocardial infarction. *Mediators of inflammation* **2005**, 175–179.
- Askevold, E. T., Gullestad, L., Dahl, C. P., Yndestad, A., Ueland, T. and Aukrust, P.** (2014). Interleukin-6 signaling, soluble glycoprotein 130, and inflammation in heart failure. *Curr Heart Fail Rep* **11**, 146–155.
- Aukrust, P., Ueland, T., Lien, E., Bendtzen, K., Muller, F., Andreassen, A. K., Nordoy, I., Aass, H., Espevik, T., Simonsen, S. et al.** (1999). Cytokine network in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* **83**, 376–382.
- Barton, P., Birks, E., Felkin, L., Cullen, M., Koban, M., Yacoub, M.** (2003). Increased expression of extracellular matrix regulators TIMP1 and MMP1 in deteriorating heart failure. *J Heart Lung Transplant* **7**, 738–744.
- Baumgärtner, W., ed.** (2015). *Allgemeine Pathologie für die Tiermedizin*: Enke. Stuttgart.
- Bearzi, C., Rota, M., Hosoda, T., Tillmanns, J., Nascimbene, A., Angelis, A. de, Yasuzawa-Amano, S., Trofimova, I., Siggins, R. W., Lecapitaine, N. et al.** (2007). Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14068–14073.
- Behr, T., Willette, R., Coatney, R., Berova, M., Angermann, C., Anderson, K., Sackner-Bernstein, J., Barone, F.** (2004). Eprosartan improves cardiac performance, reduces cardiac hypertrophy and mortality and downregulates myocardial

monocyte chemoattractant protein-1 and inflammation in hypertensive heart disease. *J Hypertens* **22**, 583–592.

**Beltrami, A. P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K. et al.** (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* **114**, 763–776.

**Beltrami, A. P., Urbanek, K., Kajstura, J., Yan, S. M., Finato, N., Bussani, R., Nadal-Ginard, B., Silvestri, F., Leri, A., Beltrami, C. A. et al.** (2001). Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* **344**, 1750–1757.

**Bergmann, O., Bhardwaj, R. D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabe-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B. A., Druid, H. et al.** (2009). Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* **324**, 98–102.

**Biffi, W. L., Moore, E. E., Moore, F. A., Carl, V. S., Kim, F. J. and Franciose, R. J.** (1994). Interleukin-6 potentiates neutrophil priming with platelet-activating factor. *Arch Surg* **129**, 1131–1136.

**Biller, B., Horauf, A. and Kraft, W.** (1998). Treatment of mitral valve insufficiency in dogs with the ACE inhibitor enalapril. A clinical progress study. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* **26**, 21–30.

**Bing, O., Conrad, C., Boluyt, M., Robinson, K. and Brooks, W.** (2002). Studies of prevention, treatment and mechanisms of heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat. *Heart Fail Rev* **7**, 71–88.

**Blankesteyn, M. and Altara, R.** (2014). *Inflammation in heart failure*: Academic Press.

**Böhm, M. and Bäumer, A.** (2000). *Herzinsuffizienz. Referenz-Reihe Kardiologie*: Thieme.

**Bolli, R., Chugh, A., D'Amario, D., Loughran, J., Stoddard, M., Ikram, S., Beache, G., Wagner, S., Leri, A., Hosoda, T. et al.** (2011). Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet* **378**, 1847–1857.

**Boluyt, M., Bing, O. and Lakatta, E.** (1995). The ageing spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from stable compensated hypertrophy to heart failure. *Eur Heart J* **16 Suppl N**, 19–30.

**Bond, B., Fox, P.** (1984). Advances in feline cardiomyopathy. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract* **5**, 1021–1038.

**Campbell, N., Kratochwil, A., Lazar, T. and Reece, J.** (2009). *Biologie*. München [u.a.]: Pearson Studium.

- Carlsen, R., Gray, S. and Pickar, J.** (1996). Na<sup>+</sup>, K<sup>(+)</sup>-pump activity and skeletal muscle contractile deficits in the spontaneously hypertensive rat. *Acta Physiol Scand* **156**, 237–245.
- Carvalho, B., Bassani, R., Franchini, K., Bassani, J.** (2006). Enhanced calcium mobilization in rat ventricular myocytes during the onset of pressure overload-induced hypertrophy *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, 1803-1813.
- Cavalera, M., Frangogiannis, N. G.** (2014). Targeting the chemokines in cardiac repair. *Curr Pharm Des* **20**, 1971–1979.
- Chen, B., Frangogiannis, N. G.** (2016). Macrophages in the Remodeling Failing Heart. *Circ Res* **119**, 776-778.
- Chimenti, I., Smith, R., Li, T.-S., Gerstenblith, G., Messina, E., Giacomello, A. and Marban, E.** (2010). Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circ Res* **106**, 971–980.
- Christensen, G.** (1993). Cardiovascular and Renal Effects of Atrial Natriuretic Factor. *Scand J Clin Lab Invest* **53**, 203-209.
- Cohn, J., 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. *J Am Coll Cardiol* **35**, 569–582.
- Collier, P., Watson, C., Voon, V., Phelan, D., Jan, A., Mak, G., Martos, R., Baugh, J., Ledwidge, M. and McDonald, K.** (2011). Can emerging biomarkers of myocardial remodelling identify asymptomatic hypertensive patients at risk for diastolic dysfunction and diastolic heart failure? *Eur J Heart Fail* **13**, 1087–1095.
- Cote, E., Manning, A., Emerson, D., Laste, N., Malakoff, R., Harpster, N.** (2004). Assessment of the prevalence of heart murmurs in overtly healthy cats. *J Am Vet Med Assoc* **3**, 384–388.
- Creemers, E., Davis, J., Parkhurst, A., Leenders, P., Dowdy, K., Hapke, E., Hauet, A., Escobar, P., Cleutjens, J., Smits, J. et al.** (2003). Deficiency of TIMP-1 exacerbates LV remodeling after myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**, H364-71.
- Dai, J., Matsui, T., Abel, E., Dedhar, S., Gerszten, R., Seidman, C., Seidman, J. and Rosenzweig, A.** (2014). Deep sequence analysis of gene expression identifies osteopontin as a downstream effector of integrin-linked kinase (ILK) in cardiac-specific ILK knockout mice. *Circ Heart Fail* **7**, 184–193.

- Damas, J., Eiken, H., Oie, E., Bjerkeli, V., Yndestad, A., Ueland, T., Tonnessen, T., Geiran, O., Aass, H., Simonsen, S. et al.** (2000). Myocardial expression of CC- and CXC-chemokines and their receptors in human end-stage heart failure. *Cardiovasc Res* **47**, 778–787.
- Davis, D., Kizana, E., Terrovitis, J., Barth, A., Zhang, Y., Smith, R., Miake, J. and Marban, E.** (2010). Isolation and expansion of functionally-competent cardiac progenitor cells directly from heart biopsies. *J Mol Cell Cardiol* **49**, 312–321.
- de Lemos, J., Morrow, D., Sabatine, M., Murphy, S., Gibson, C., Antman, E., McCabe, C., Cannon, C. and Braunwald, E.** (2003). Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* **107**, 690–695.
- Deten, A., Christian Volz, H., Briest, W. and Zimmer, H.-G.** (2002). Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. *Cardiovasc Res* **02**, 330–340.
- Detweiler, D. and Patterson, D.** (1965). The prevalence and types of cardiovascular disease in dogs. *Ann N Y Acad Sci* **127**, 481–516.
- Deutsche Forschungsgemeinschaft** (2010-2015). Was sind Stammzellen?
- Dimmeler, S., Zeiher, A. and Schneider, M.** (2005). Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest* **115**, 572–583.
- Dirven, M. and Cornelissen, J.** (2009). Arterial thromboembolism in cats. *Tijdschr Diergeneeskd* **134**, 974–980.
- Durdu, S., Deniz, G., Dogan, A., Zaim, C., Karadag, A., Dastouri, M. and Akar, A.** (2012). Stem cell mediated cardiovascular repair. *Can J Physiol Pharmacol* **90**, 337–351.
- Dzau, V., Burt, D., Pratt, R.** (1988). Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Am J Physiol* **255**, 563-573.
- Elbashir, S., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T.** (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.
- Elmas, E., Lang, S., Dempfle, C., Kälsch, T., Hannak, D., Sueselbeck, T., Wolpert, C., Borggrefe, M. and Brueckmann, M.** (2007). High plasma levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and interleukin-8 (IL-8) characterize patients prone to ventricular fibrillation complicating myocardial infarction. *Clinical chemistry and laboratory medicine CCLM / FESCC* **45**, 1360–1365.
- Engelhardt, W. v. and Ahrens, F.** (2005). *Physiologie der Haustiere. 99 Tabellen.* Stuttgart: Enke.

- Erdmann, E.** (2011). *Klinische Kardiologie. Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße*. 169 Tabellen und 106 Übersichten. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Eulert-Grehn, J.-J.** (2013). Vergleichende Analysen der Expression kardialer Gene in einem doppelt transgenen SERCA2/Renin-Hypertoniemodell. Dissertation.
- Fa. Qiagen GmbH.** Flexible-RNAi-Technologies-You-Can-Rely-On.
- Feygin, J., Mansoor, A., Eckman, P., Swingen, C., Zhang, J.** (2007) Functional and bioenergetic modulations in the infarct border zone following autologous mesenchymal stem cell transplantation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **3**, H1772-80.
- Foronjy, R., Sun, J., Lemaitre, V. and D'Armiento, J.** (2008). Transgenic expression of matrix metalloproteinase-1 inhibits myocardial fibrosis and prevents the transition to heart failure in a pressure overload mouse model. *Hypertens Res* **31**, 725–735.
- Frangogiannis, N. G.** (2004a). Targeting the Chemokines in Myocardial Inflammation. *Circulation* **110**, 1341–1342.
- Frangogiannis, N. G.** (2004b). The role of the chemokines in myocardial ischemia and reperfusion. *Curr Vasc Pharmacol* **2**, 163–174.
- Frangogiannis, N. G.** (2012). Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res* **110**, 159–173.
- Frangogiannis, N. G. and Entman, M. L.** (2005). Chemokines in myocardial ischemia. *Trends Cardiovasc Med* **15**, 163–169.
- Fredersdorf S., Thumann, C., Zimmermann, W., Vetter, R., Graf, T., Luchner, A., Riegger, G., Schunkert, H., Eschenhagen, T., Weil, W.** (2012). Increased myocardial SERCA expression in early type 2 diabetes mellitus is insulin dependent: In vivo and in vitro data. *Cardiovasc Diabetol* Epub.
- Fried, T., Osgood, R., Stein, J.** (1988) Tubular site(s) of action of atrial natriuretic peptide in the rat (1988). *Am J Physiol* **2**, 313-316.
- Friedland, J.; Suputtamongkol, Y.; Remick, D.; Chaowagul, W.; Strieter, R.; Kunkel, S.; White, N.;** (1992). Prolonged Elevation of Interleukin-8 and Interleukin-6 Concentrations in Plasma and of Leukocyte Interleukin-8. *Infect. Immun.* **60**, 2402–2408.
- Fuchs, M., Hilfiker, A., Kaminski, K., Hilfiker-Kleiner, D., Guener, Z., Klein, G., Podewski, E., Schieffer, B., Rose-John, S. and Drexler, H.** (2003). Role of interleukin-6 for LV remodeling and survival after experimental myocardial infarction. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17**, 2118–2120.

- Fujio, Y., Maeda, M., Mohri, T., Obana, M., Iwakura, T., Hayama, A., Yamashita, T., Nakayama, H. and Azuma, J.** (2011). Glycoprotein 130 Cytokine Signal as a Therapeutic Target Against Cardiovascular Diseases. *J Pharmacol Sci* **117**, 213–222.
- Gabrisch, K. and Zwart, P.** (2005). *Krankheiten der Heimtiere*. Hannover: Schlütersche.
- Garrido, V., Mendoza-Torres, E., Riquelme, J., Diaz, A., Pizarro, M., Bustamante, M., Chavez, M., Ocaranza, M., Mellado, R., Corbalan, R., Allende, M., Lavandero, S.** (2017). Novel Therapies Targeting Cardioprotection and Regeneration. *Curr Pharm Des*, Epub.
- Ghigo, A., Franco, I., Morello, F. and Hirsch, E.** (2014). Myocyte signalling in leucocyte recruitment to the heart. *Cardiovasc Res* **102**, 270–280.
- Ghosh, R., Gilda, J., Gomes, A.** (2014). The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert Rev Proteomics* **11**, 549-60.
- Gnecchi, M., Zhang, Z., Ni, A. and Dzau, V.** (2008). Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res* **103**, 1204–1219.
- Gough, A. and Thomas, A.** (2009). *Rassedispositionen bei Hund und Katze*. München, Jena: Elsevier, Urban & Fischer.
- Gullestad, L., Ueland, T., Vinge, L. E., Finsen, A., Yndestad, A. and Aukrust, P.** (2012). Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers. *Cardiology* **122**, 23–35.
- Guo, J., Zhang, H., Xiao, J., Wu, J., Ye, Y., Li, Z., Zou, Y., Li, X.** (2013). Monocyte Chemotactic Protein-1 Promotes the Myocardial Homing of Mesenchymal Stem Cells in Dilated Cardiomyopathy. *Int. J. Mol. Sci* **4**, 8164–8178.
- Gupta, S. P.** (2012). *Matrix metalloproteinase inhibitors. Specificity of binding and structure-activity relationships*. Basel, New York: Springer.
- Gwechenberger, M., Mendoza, L., Youker, K., Frangogiannis, N. G., Smith, C., Michael, L. and Entman, M.** (1999). Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation* **99**, 546–551.
- Hannigan, G., Coles, J. and Dedhar, S.** (2007). Integrin-linked kinase at the heart of cardiac contractility, repair, and disease. *Circ Res* **100**, 1408–1414.
- Hansson, J., Lind, L., Hulthe, J. and Sundstrom, J.** (2009). Relations of serum MMP-9 and TIMP-1 levels to left ventricular measures and cardiovascular risk factors: a population-based study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* **16**, 297–303.
- Harmer, A., Abi-Gerges, N., Morton, M., Pullen, G., Valentin, J. and Pollard, C.** (2012). Validation of an in vitro contractility assay using canine ventricular myocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **260**, 162–172.

- Haugen, E., Chen, J., Wikstrom, J., Gronros, J., Gan, L. and Fu, L.** (2007). Parallel gene expressions of IL-6 and BNP during cardiac hypertrophy complicated with diastolic dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Int J Cardiol* **115**, 24–28.
- Heger, J., Schiegnitz, E., Waldthausen, D. von, Anwar, M., Piper, H. M. and Euler, G.** (2010). Growth differentiation factor 15 acts anti-apoptotic and pro-hypertrophic in adult cardiomyocytes. *J. Cell. Physiol.* **224**, 120–126.
- Heinrich, P., Müller, M. and Graeve, L.** (2012). *Biochemie des Menschen. Mit Molekularbiologie und Pathobiochemie*. Berlin: Springer Berlin.
- Helgason, C. and Miller, C.** (op. 2005). *Basic cell culture protocols*. Totowa, N.J.: Humana Press.
- Helseth R., Opstad T., Siegbahn A., Solheim S., Freynhofer M., Huber K., Arnesen H., Seljeflot S.** (2015). Associations between circulating proteins and corresponding genes expressed in coronary thrombi in patients with acute myocardial infarction. *Thromb Res* **136**, 1240-1244.
- Heymans, S., Schroen, B., Vermeersch, P., Milting, H., Gao, F., Kassner, A., Gillijns, H., Herijgers, P., Flameng, W., Carmeliet, P. et al.** (2005). Increased cardiac expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 is related to cardiac fibrosis and dysfunction in the chronic pressure-overloaded human heart. *Circulation* **112**, 1136–1144.
- Himi, T., Yoshioka, I. and Kataura, A.** (1997). Production and gene expression of IL-8-like cytokine GRO/CINC-1 in rat nasal mucosa. *Acta Otolaryngol* **117**, 123–127.
- Hirota, H., Yoshida, K., Kishimoto, T. and Taga, T.** (1995). Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin-6-related cytokines, causes myocardial hypertrophie in mice. Interleukin-6-Receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 4862–4866.
- Hohensinner, P., Niessner, A.; Huber, K., Weyand, C.; Wojta, J.** (2011). Inflammation and cardiac outcome. *Curr Opin Infect Dis* **3**, 259-264.
- Huang, M., Du Yang, Xiang, M. and Wang, J.** (2014). Role of interleukin-6 in regulation of immune responses to remodeling after myocardial infarction. *Heart Fail Rev* **20**, 25-38.
- Iqbal, N., Alim, K. S., Aramin, H., Iqbal, F., Green, E., Higginbotham, E. and Maisel, A. S.** (2013). Novel biomarkers for heart failure. *Expert Rev Cardiovasc Ther* **11**, 1155–1169.
- Janeway, C. and Travers, P., eds.** (1997). *Immunologie*: Spektrum Akademischer Verlage Heidelberg.
- Janvier Labs.** SHR Ratte.

- Jeziarska-Wozniak, K., Mystkowska, D., Tutas, A. and Jurkowski, M.** (2011). Stem cells as therapy for cardiac disease - a review. *Folia Histochem Cytobiol* **49**, 13–25.
- Joho, S., Ishizaka, S., Sievers, R., Foster, E., Simpson, P., Grossman, W.** (2007). Left ventricular pressure-volume relationship in conscious mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, 369–77.
- Joulin, O., Petillot, P., Labalette, M., Lancel, S. and Neviere, R.** (2007). Cytokine profile of human septic shock serum inducing cardiomyocyte contractile dysfunction. *Physiol Res* **56**, 291–297.
- Kafke, W.** (2011) Bestimmung von Zytokinexpressionsprofilen aus humanen Blut- und Hautproben bei Patienten mit small fiber Neuropathie. *Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der medizinischen Fakultät der Bayrischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg*. Würzburg
- Kang, S., Lim, H., Choi, B., Choi, S., Hwang, G., Yoon, M., Tahk, S. and Shin, J.** (2008). Longitudinal strain and torsion assessed by two-dimensional speckle tracking correlate with the serum level of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, a marker of myocardial fibrosis, in patients with hypertension. *J Am Soc Echocardiogr* **21**, 907–911.
- Keith, M. and Bolli, R.** (2015). "String Theory" of c-kit<sup>pos</sup> Cardiac Cells: A New Paradigm Regarding the Nature of These Cells That May Reconcile Apparently Discrepant Results. *Circ Res* **116**, 1216–1230.
- Kempf, T., Haehling, S. von, Peter, T., Allhoff, T., Cicoira, M., Doehner, W., Ponikowski, P., Filippatos, G., Rozentryt, P., Drexler, H. et al.** (2007). Prognostic utility of growth differentiation factor-15 in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* **50**, 1054–1060.
- Kempf, T., Zarbock, A., Widera, C., Butz, S., Stadtmann, A., Rossaint, J., Bolomini-Vittori, M., Korf-Klingebiel, M., Napp, L., Hansen, B. et al.** (2011). GDF-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice. *Nat Med* **17**, 581–588.
- Kinugawa, K., Takahashi, T., Kohmoto, O., Yao, A., Aoyagi, T., Momomura, S., Hirata, Y. and Serizawa, T.** (1994). Nitric oxide-mediated effects of interleukin-6 on Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> and cell contraction in cultured chick ventricular myocytes. *Circ Res* **75**, 285–295.
- Kobara, M., Noda, K., Kitamura, M., Okamoto, A., Shiraishi, T., Toba, H., Matsubara, H. and Nakata, T.** (2010). Antibody against interleukin-6 receptor attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res* **87**, 424–430.

- Kohn, B., Niemand, H. and Suter, P.** (2012). *Praktikum der Hundeklinik*. Stuttgart: Enke.
- Krehbiehl, N.-K.** (2010). *Auswirkungen einer systemischen Hypertonie auf parakrine Effekte kardialer Progenitorzellen*. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet., Justus-Liebig-Universität Gießen. Gießen.
- Krueger, U., Bergauer, T., Kaufmann, B., Wolter, I., Pilk, S., Heider-Fabian, M., Kirch, S., Artz-Oppitz, C., Isselhorst, M. and Konrad, J.** (2007). Insights into effective RNAi gained from large-scale siRNA validation screening. *Oligonucleotides* **17**, 237–250.
- Kuwahara, F., Kai, H., Tokuda, K., Takeya, M., Takeshita, A., Egashira, K. and Imaizumi, T.** (2004). Hypertensive myocardial fibrosis and diastolic dysfunction: another model of inflammation? *Hypertension* **43**, 739–745.
- Kyhse-Andersen, J.** (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**, 203–209.
- Laugwitz, K., Moretti, A., Lam, J., Gruber, P., Chen, Y., Woodard, S., Lin, L., Cai, C.-L., Lu, M., Reth, M. et al.** (2005). Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* **433**, 647–653.
- Leri, A., Rota, M., Pasqualini, F. S., Goichberg, P. and Anversa, P.** (2015). Origin of cardiomyocytes in the adult heart. *Circ Res* **116**, 150–166.
- Lin, Y.-M., Chang, Z.-L., Liao, Y.-Y., Chou, M.-C. and Tang, C.-H.** (2013). IL-6 promotes ICAM-1 expression and cell motility in human osteosarcoma. *Cancer Lett* **328**, 135–143.
- Lindsay, M., Maxwell, P. and Dunn, F.** (2002). TIMP-1: a marker of left ventricular diastolic dysfunction and fibrosis in hypertension. *Hypertension* **40**, 136–141.
- Linke, A., Muller, P., Nurzynska, D., Casarsa, C., Torella, D., Nascimbene, A., Castaldo, C.; Cascapera, S., Bohm, M., Quaini, F.** (2005). Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA* **25**, 8966–8971.
- Liu, H., Wang, H., Tao, L., Li, C., Li, F., Zhang, Y. and Liu, B.** (2013). Stress-induced growth-differentiation factor 15 plays an intriguing role in cardiovascular diseases. *Chin Med J (Engl)* **126**, 1350–1354.
- Liu, M., Nagai, T., Tokunaga, M., Iwanaga, K., Matsuura, K., Takahashi, T., Kanda, M., Kondo, N., Naito, A. T., Komuro, I. et al.** (2014). Anti-inflammatory peptides from cardiac progenitors ameliorate dysfunction after myocardial infarction. *J Am Heart Assoc* **3**, e001101.

- Liu, S. and Tilley, L.** (1980). Animal models of primary myocardial diseases. *Yale J Biol Med* **53**, 191–211.
- Lovelock, J., Baker, A., Gao, F., Dong, J., Bergeron, A., McPheat, W., Sivasubramanian, N. and Mann, D.** (2005). Heterogeneous effects of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases on cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**, H461-8.
- Lyon, R., Zanella, F., Omens, J. and Sheikh, F.** (2015). Mechanotransduction in Cardiac Hypertrophy and Failure. *Circ Res* **116**, 1462–1476.
- Malliaras, K., Makkar, R., Smith, R., Cheng, K., Wu, E., Bonow, R., Marbán, L., Mendizabal, A., Cingolani, E., Johnston, P. et al.** (2014). Intracoronary cardiosphere-derived cells after myocardial infarction: evidence of therapeutic regeneration in the final 1-year results of the CADUCEUS trial (CARDiosphere-Derived autologous stem CELls to reverse ventricular dysfunction). *J Am Coll Cardiol* **63**, 110–122.
- Mannello, F. and Tonti, G.** (2007). Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! *Stem Cells* **25**, 1603–1609.
- Mao, Q., Lin, C., Liang, X., Gao, J. and Xu, B.** (2013). Mesenchymal stem cells overexpressing integrin-linked kinase attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. *Mol Med Rep* **7**, 1617–1623.
- Matsushita, K., Iwanaga, S., Oda, T., Kimura, K., Shimada, M., Sano, M., Umezawa, A., Hata, J.-i. and Ogawa, S.** (2005). Interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor complex reduces infarct size via inhibiting myocardial apoptosis. *Lab Invest* **85**, 1210–1223.
- Maxeiner, H., Krehbiehl, N., Müller, A., Woitasky, N., Akintürk, H., Müller, M., Weigand, M., Abdallah, Y., Kasseckert, S., Schreckenber, R. et al.** (2010). New insights into paracrine mechanisms of human cardiac progenitor cells. *Eur J Heart Fail* **12**, 730–737.
- Maxeiner, H., Mufti, S., Krehbiehl, N., Dülfer, F., Helmig, S., Schneider, J., Böning, A., Matejec, R., Weigand, M., Schlüter, K.-D. et al.** (2014). Interleukin-6 Contributes to the Paracrine Effects of Cardiospheres Cultured from Human, Murine and Rat Hearts. *J Cell Physiol* **229**, 1681-1689.
- McGavin, D. and Zachary, J.** (2009). *Pathologie der Haustiere. Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie*. München: Urban & Fischer, Elsevier.

- Melendez, G., McLarty, J., Levick, S., Du, Y., Janicki, J. and Brower, G.** (2010). Interleukin 6 mediates myocardial fibrosis, concentric hypertrophy, and diastolic dysfunction in rats. *Hypertension* **56**, 225–231.
- Messina, De Angelis, Frati, Morrone, S., Chimenti, S., Fiordaliso, F., Salio, M., Battaglia, M., V. Latronico, M., Coletta, M. et al.** (2004). Isolation and Expansion of Adult Cardiac Stem Cells From Human and Murine Heart. *Circ Res* **95**, 911–921.
- Meurs, K., Spier, A., Miller, M., Lehmkuhl, L. and Towbin, J.** (1999). Familial ventricular arrhythmias in boxers. *J Vet Intern Med* **13**, 437–439.
- Michler, R.** (2013). Stem Cell Therapy for Heart Failure. *Methodist Debaquey Cardiovasc J* **9**, 187–194.
- Miguel-Carrasco, J., Zambrano, S., Blanca, A., Mate, A., Vazquez, C.** (2010). Captopril reduces cardiac inflammatory markers in spontaneously hypertensive rats by inactivation of NF- $\kappa$ B. *J Inflamm* **7**, 21.
- Milani-Nejad, N. and Janssen, Paul M.** (2014). Small and large animal models in cardiac contraction research: advantages and disadvantages. *Pharmacol Therapeut* **141**, 235–249.
- Mitcheson, J., Hancox, J. and Levi, A.** (1998). Cultured adult cardiac myocytes: future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties. *Cardiovasc Res* **39**, 280–300.
- Moraga I., Spangler, J., Mendoza, J., Garcia, C.** (2014). Multifarious Determinants of Cytokine Receptor Signaling Specificity. *Adv Immunol* **121**, 1–39.
- Morimoto, H., Takahashi, M., Izawa, A., Ise, H., Hongo, M., Kolattukudy, P. and Ikeda, U.** (2006). Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Circ Res* **99**, 891–899.
- Most, P., Bernotat, J., Ehlermann, P., Pleger, S., Reppel, M., Borries, M., Niroomand, F., Pieske, B., Janssen, P. M., Eschenhagen, T. et al.** (2001). S100A1: a regulator of myocardial contractility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13889–13894.
- Müller, A.** (2010). *Die parakrine Wirkung kardialer Progenitorzellen auf die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten*. Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin, Justus-Liebig-Universität Gießen. Gießen.
- Murakami, M., Hirano, T.** (2012). The pathological and physiological roles of IL-6 amplifier activation. *Int J Biol Sci* **8**, 1267–1280.
- Nishimura, H.** (2016). Renin-angiotensin system in vertebrates: phylogenetic view of structure and function. *Anat Sci Int*, EPub.

- Nunez Garcia, A., Sanz-Ruiz, R., Fernandez Santos, Maria Eugenia and Fernandez-Aviles, F.** (2015). "Second-generation" stem cells for cardiac repair. *World J Stem Cells* **7**, 352–367.
- Nymo, S. H., Hulthe, J., Ueland, T., McMurray, J., Wikstrand, J., Askevold, E. T., Yndestad, A., Gullestad, L. and Aukrust, P.** (2014). Inflammatory cytokines in chronic heart failure: interleukin-8 is associated with adverse outcome. Results from CORONA. *Eur J Heart Fail* **16**, 68–75.
- Ohnishi, S., Yasuda, T., Kitamura, S. and Nagaya, N.** (2007). Effect of hypoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells. *Stem Cells* **25**, 1166–1177.
- Okamoto, K.** (1969). Spontaneous hypertension in rats. *Int Rev Exp Pathol* **7**, 227-70.
- Ono, K., Matsumori, A., Furukawa, Y., Igata, H., Shioi, T., Matsushima, K., Sasayama, S.** (2009). Prevention of myocardial reperfusion injury in rats by an antibody against monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1. *Lab Invest* **79**, 195–203.
- Pagliari, S., Romanazzo, S., Mosqueira, D., Pinto-do-O, P., Aoyagi, T. and Forte, G.** (2013). Adult stem cells and biocompatible scaffolds as smart drug delivery tools for cardiac tissue repair. *Curr Med Chem* **20**, 3429–3447.
- Paśnik J., Moll J., Cywińska-Bernas A., Moll J., Sysa A., Zeman, K.** (2007). Proteolytic and cytokine balance abnormalities in children with congenital heart disease undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Cardiol Pol* **65**, 1208-1214.
- Pedersen, B., Akerstrom, Thorbjorn C., Nielsen, A. and Fischer, C.** (2007). Role of myokines in exercise and metabolism. *J Appl Physiol (1985)* **103**, 1093–1098.
- Periasamy, M. and Kalyanasundaram, A.** (2007). SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve* **35**, 430–442.
- Peter, A., Cheng, H., Ross, R., Knowlton, K. and Chen, J.** (2011). The costamere bridges sarcomeres to the sarcolemma in striated muscle. *Prog Pediatr Cardiol* **31**, 83–88.
- Piacentino, V., Weber, C., Chen, X., Weisser-Thomas, J., Margulies, K., Bers, D. and Houser, S.** (2003). Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circ Res* **92**, 651–658.
- Pinto, Y., Paul, M. and Ganten, D.** (1998). Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res* **39**, 77–88.
- Piper, H. M.** (1990). *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

- Piper, H. M., Probst, I., Schwartz, P., Hutter, F. J. and Speckermann, P.** (1982). Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **14**, 397–412.
- Pleger, S., Remppis, A., Heidt, B., Volkers, M., Chuprun, J., Kuhn, M., Zhou, R.-H., Gao, E., Szabo, G., Weichenhan, D. et al.** (2005). S100A1 gene therapy preserves in vivo cardiac function after myocardial infarction. *Mol Ther* **12**, 1120–1129.
- Prabhu, S.** (2004). Cytokine-induced modulation of cardiac function. *Circ Res* **95**, 1140–1153.
- Pschyrembel, W.** (2013). *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 2014*. Berlin [u.a.]: De Gruyter.
- Quetin, Michael** (2009). Regionale Unterschiede der Kaliumkanal-Expression und Aktionspotentialdauer am Herzen sind assoziiert mit der räumlichen Heterogenität des myokardialen Flusses. *Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R. and Deutzmann, R., eds.** (2012). *Biochemie. 5 Zytokine*. Duale Reihe: Georg Thieme Verlag. Stuttgart.
- Reid, I., Morris, B., Ganong, W.** (1987). The renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol* **40**, 377-410.
- Ren, G., Dewald, O. and Frangogiannis, N. G.** (2003). Inflammatory mechanisms in myocardial infarction. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **2**, 242–256.
- Renz, Prof. Dr. H.** (2014). Laboratoriumsmedizinisches Untersuchungsprogramm. Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Molekulare Diagnostik, UKGM Gießen und Marburg.
- Robak, T., Gladalska, A., Stepień, H. and Robak, E.** (1998). Serum levels of interleukin-6 type cytokines and soluble interleukin-6 receptor in patients with rheumatoid arthritis. *Mediat Inflamm* **7**, 347–353.
- Rohde, D., Busch, M., Volkert, A., Ritterhoff, J., Katus, H: A., Peppel, K., Most, P.** (2015) Cardiomyocytes, endothelial cells and cardiac fibroblasts: S100A1's triple action in cardiovascular pathophysiology. *Future Cardiol* **11**, 309–321.
- Romero-Vasquez, F., Chavez, M., Perez, M., Arcaya, J., Garcia, A., Rincon, J. and Rodriguez-Iturbe, B.** (2012). Overexpression of HGF transgene attenuates renal inflammatory mediators, Na(+)-ATPase activity and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Biochim Biophys Acta* **1822**, 1590–1599.
- Rose-John, S.** (2012). IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci* **8**, 1237–1247.
- Roth, G., Bader, D. and Pfaltzgraff, E.** (2014). Isolation and physiological analysis of mouse cardiomyocytes. *J Vis Exp*, e51109.

- Scheufen, Sandra** (2012). *Morphologische, funktionelle und parakrine Aspekte kardialer Primärkulturen und deren Beeinflussung durch Veränderungen des Umgebungsmilieus*. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet., Justus-Liebig-Universität Gießen. Gießen.
- Schmidt, R., Thews, G. and Lang, F.** (2000). *Physiologie des Menschen*: Springer.
- Schmitz, K.** (2005). *From cell penetrating peptides to peptoids and polyamines as novel artificial molecular transporters*. Dissertation, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Bonn.
- Schneider, A.** (2014). *Regulation von Interleukin 6 (IL-6) durch den Angiotensin Typ 1 Rezeptorblocker Valsartan im Rahmen einer chronischen Mikroinflammation bei Patienten mit einer essentiellen arteriellen Hypertonie und einem Diabetes mellitus Typ 2*. Dissertation, Medizinischen Fakultät Charité. Berlin.
- Schneider, F. and Fink, G.** (2013). *Funktionelle MRT in Psychiatrie und Neurologie*. Berlin: Springer.
- Schopfer, D., Ku, I., Regan, M. and Whooley, M.** (2014). Growth differentiation factor 15 and cardiovascular events in patients with stable ischemic heart disease (The Heart and Soul Study). *Am Heart J* **167**, 186-192.e1.
- Secchiero, P., Corallini, F., Gonelli, A., Dell'Eva, R., Vitale, M., Capitani, S., Albini, A. and Zauli, G.** (2007). Antiangiogenic activity of the MDM2 antagonist nutlin-3. *Circ Res* **100**, 61–69.
- Segers, Vincent F, Tokunou, T., Higgins, L., MacGillivray, C., Gannon, J. and Lee, R.** (2007). Local delivery of protease-resistant stromal cell derived factor-1 for stem cell recruitment after myocardial infarction. *Circulation* **116**, 1683–1692.
- Seino, Y., Ikeda, U., Minezaki, K., Funayama, H., Kasahara, T., Konishi, K. and Shimada, K.** (1995). Expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **27**, 2043–2051.
- Sen, A., Most, P. and Peppel, K.** (2014). Induction of microRNA-138 by pro-inflammatory cytokines causes endothelial cell dysfunction. *FEBS Lett* **588**, 906–914.
- Sharma, H. and Das, D.** (1997). Role of cytokines in myocardial ischemia and reperfusion. *Mediat Inflamm* **6**, 175–183.
- Shin, M., Lee, K., Chung, J., Park, Y., Choi, M., Oh, J., Choi, J., Lee, S., Chung, N., Kang, S.** (2009). Circulating IL-8 levels in heart failure patients with and without metabolic syndrome. *Clin Chim Acta* **405**, 139–142.
- Siegenthaler, W. and Blum, H.** (2006). *Klinische Pathophysiologie*: Thieme.
- Soonpaa, M. and Field, L.** (1998). Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ Res* **83**, 15–26.

- Springuel, L., Renauld, J., Knoops, L.** (2015). JAK kinase targeting in hematologic malignancies: a sinuous pathway from identification of genetic alterations towards clinical indications. *Haematol* **10**, 1240-1253.
- Stammers, A., Susser, S., Hamm, N., Hlynsky, M., Kimber, D., Kehler, D. and Duhamel, T.** (2015). The regulation of sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPases (SERCA). *Can J Physiol Pharmacol*, 1–12.
- Stayton, P., Freitag, S., Klumb, L., Chilkoti, A., Chu, V., Penzotti, J., Ro, R., Hyre, D., Le Trong, I., Lybrand, T., Stenkamp, R.** (1999). Streptavidin-biotin binding energetics. *Biomol Eng.* **16**, 39-44.
- Sundstrom, J., Evans, J., Benjamin, E., Levy, D., Larson, M., Sawyer, D., Siwik, A., Colucci, W., Wilson, Peter W and Vasan, R.** (2004). Relations of plasma total TIMP-1 levels to cardiovascular risk factors and echocardiographic measures: the Framingham heart study. *Eur Heart J* **25**, 1509–1516.
- Sledz, C., Williams, B.** (2005). RNA interference in boplogy and disease. *Blood* **106**, 787-794.
- Tan, S., Gomes, R., Yeoh, K., Perbellini, F., Malandraki-Miller, S., Ambrose, L., Heather, L., Faggian, G., Schofield, C., Davies, K., Clarke, K., Carr, C.** (2015). Preconditioning of cardiosphere-derived cells with hypoxia or prolyl-4-hydroxylase inhibitors increases stemness and decreases reliance on oxidative metabolism. *Cell Transplant* **25**, 35-53.
- Tayebjee, M., Nadar, S., MacFadyen, R. and Lip, Gregory Y.** (2004). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-9 levels in patients with hypertension Relationship to tissue Doppler indices of diastolic relaxation. *Am J Hypertens* **17**, 770–774.
- Taylor, S., Posch, A.** (2014). The design of a quantitative western blot experiment. *Biomed Res Int*. Epub
- Testa, M., Yeh, M., Lee, P., Berman, J. W., Lejemtel, T. H., Fanelli, R. and Loperfido, F.** (1996). Circulating Levels of Cytokines and Their Endogenous Modulators in Patients With Mild to Severe Congestive Heart Failure Due to Coronary Artery Disease or Hypertension. *J Am Coll Cardiol* **28**, 964–971.
- Tobias, R., Skrodzki, M., Schneider, M. and Nautrup, C.** (2008). *Kleintierkardiologie kompakt*. Hannover: Schlütersche.
- Tonnessen, T., Florholmen, G., Henriksen, U. and Christensen, G.** (2003). Cardiopulmonary alterations in mRNA expression for interleukin-1beta, the interleukin-6 superfamily and CXC-chemokines during development of postischaemic heart failure in the rat. *Clin Physiol Funct Imaging* **23**, 263–268.

- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology*. **24**, 145-149.
- Trofimov, E. and Poskrebysheva, A.** (2015). Study on Activity of Inflammatory Factors in Patients with Chronic Heart Failure Depending on the Stage of the Disease and NYHA Class. *Bull Exp Biol Med* **158**, 614–616.
- Uchinaka, A., Kawaguchi, N., Mori, S., Hamada, Y., Miyagawa, S., Saito, A., Sawa, Y. and Matsuura, N.** (2014). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -3 improves cardiac function in an ischemic cardiomyopathy model rat. *Tissue Eng Part A* **20**, 3073–3084.
- Uemura, R., Xu, M., Ahmad, N. and Ashraf, M.** (2006). Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circ Res* **98**, 1414–1421.
- Van Vleet, J. and Ferrans, V.** (1986). Myocardial diseases of animals. *Am J Pathol* **124**, 98–178.
- Vanhoutte, D., Schellings, M., Pinto, Y. and Heymans, S.** (2006). Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window. *Cardiovasc Res* **69**, 604–613.
- Villegas, S., Villarreal, F., Dillmann, W.** (2000). Leukemia Inhibitory Factor and Interleukin-6 downregulate sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase (SERCA2) in cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol* **95**, 47–54.
- Wan, S. and Yim, A.** (1999). Cytokines in myocardial injury: impact on cardiac surgical approach. *Eur J Cardiothorac Surg* **16 Suppl 1**, S107-11.
- Wang, X., Hu, Q., Nakamura, Y., Lee, J., Zhang, G., From, Arthur H. and Zhang, J.** (2006). The role of the sca-1+/CD31- cardiac progenitor cell population in postinfarction left ventricular remodeling. *Stem Cells* **24**, 1779–1788.
- Weir, R., Clements, S., Steedman, T., Dargie, H., McMurray, John J., Squire, I. and Ng, L.** (2011). Plasma TIMP-4 predicts left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *J Card Fail* **17**, 465–471.
- Wess, G., Schulze, A., Butz, V., Simak, J., Killich, M., Keller, L. Maeurer, J., Hartmann, K.** (2010). Prevalence of dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers in various age groups. *J Vet Intern Med* **3**, 533–538.
- Westermeier, R. and Marouga, R.** (2005). Protein detection methods in proteomics research. *Biosci Rep* **25**, 19–32.
- Williams, K.** (2003). Coronary arteriosclerosis with myocardial atrophy in a 13-year-old dog. *Vet Pathol* **40**, 695–697.

**Xu, J., Kimball, T., Lorenz, J., Brown, D., Bauskin, A., Klevitsky, R., Hewett, T., Breit, S. and Molkentin, J.** (2006). GDF15/MIC-1 functions as a protective and antihypertrophic factor released from the myocardium in association with SMAD protein activation. *Circ Res* **98**, 342–350.

**Younce, C., Niu, J., Ayala, J., Burmeister, M., Smith, L., Kolattuukudy, P., Ayala, J.** (2014). Exending-4 improves cardiac function in mice overexpressing monocyte chemoattractant protein-1 in cardiomyocytes. *J Moll Cell Cardiol* **76**, 172-176.

**Yu, J., Lu, Y., Li, Y., Xiao, L., Xing, Y., Li, Y. and Wu, L.** (2015). Role of S100A1 in hypoxia-induced inflammatory response in cardiomyocytes via TLR4/ROS/NF-kappaB pathway. *J Pharm Pharmacol* **67**, 1240-1250.

**Zamilpa, R., Navarro, M., Flores, I. and Griffey, S.** (2014). Stem cell mechanisms during left ventricular remodeling post-myocardial infarction: Repair and regeneration. *World J Cardiol* **6**, 610–620.

**Zu Eulenburg, Gräfin, K.** (2007). Die Rolle von IFN $\gamma$  in der Immunregulation. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor rerum naturalium, Humboldtuniversität Berlin. Berlin.

## 9 Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Münzenberg, im Juni 2017

Friederike Dülfer

### 10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Sibylle Wenzel für die Ermöglichung dieser Arbeit mit den für mich perfekten Rahmenbedingungen. Trotz manchmal schwieriger Umstände, stand sie mir stets mit Rat und Tat zur Seite und war die beste Doktormutter, die ich mir hab wünschen können.

Danken möchte ich ebenso PD Dr. Hagen Maxeiner für den Kontakt zur Klinik für Herz-, Kinderherz- und Gefäßchirurgie sowie der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie des Universitätsklinikums Gießen & Marburg und die vielfältige Unterstützung und Ermöglichung dieser Arbeit.

Des Weiteren gilt mein Dank Prof. Dr. K.-D. Schlüter, Prof. Dr. J. Schneider, PD Dr. J. Heger und Dr. Simone Helmig für die Zurverfügungstellung ihrer Labore und ihres Wissens.

Herrn Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger danke ich für die Betreuung dieser Arbeit im Fachbereich Veterinärmedizin und die konstruktive Kritik.

Ganz herzlich möchte ich mich bei vor allem bei Daniela Schreiber, Gudrun Pfeiffer, Nadine Woitasky, Monika Phillip und Juliane Döhrel bedanken. Ohne deren unermüdlige Unterstützung wäre diese Arbeit nie möglich gewesen. Und auch Birgitt Störr, Peter Volk, Franziska Nippert, Isabella Sniegon, Dr. Rolf Schreckenbergs und Frank Queckbörners gilt mein Dank.

Auch PD Dr. Michael Bette, Kerstin und Lisa Reumke, Babsch Spengler, Axel Otto, Hoschy Daschner und Dr. Charlotte von Zadow danke ich für ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit.

Schließlich danke ich Metin, Bernd, Beate und Großmutter von ganzem Herzen für ihre Unterstützung in jeder Lebenslage. Ohne Euch wäre ich nie soweit gekommen.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6624-6



Photo cover: © SomkiatFakmee @ iStockPhoto.com