

# **„Expressionsanalyse mechanisch aktivierter kardialer Fibroblasten“**

Inauguraldissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von  
Knoblauch, Annalena  
aus Lich

Gießen (2024)

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System

Zentrum für Innere Medizin

Gutachter: Prof. Dr. Ralph Schermuly

Gutachter: Prof. Dr. Oliver Dörr

Tag der Disputation: 21.08.2024

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Die Anatomie und Physiologie des kardio-pulmonalen Systems .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2.</b>	<b>Pulmonale Hypertonie .....</b>	<b>3</b>
1.2.1.	Pulmonale arterielle Hypertonie .....	5
1.2.2.	Symptome .....	6
1.2.3.	Klassifikation .....	7
1.2.4.	Therapie .....	7
1.2.4.1.	Kalziumantagonist .....	8
1.2.4.2.	Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (ERA) .....	8
1.2.4.3.	sGC-Stimulator .....	9
1.2.4.4.	Phosphodiesterase-5-Inhibitoren .....	9
1.2.4.5.	Prostacyclin-Agonisten und Prostacyclinrezeptor-Agonisten .....	9
<b>1.3.</b>	<b>Therapie des akuten Rechtsherzversagens.....</b>	<b>10</b>
<b>1.4.</b>	<b>Kardiale Fibroblasten.....</b>	<b>11</b>
<b>1.5.</b>	<b>Aufbau und Funktion der Extrazellulären Matrix.....</b>	<b>12</b>
<b>1.6.</b>	<b>Strukturelle und funktionelle Veränderungen des Herzmuskels.....</b>	<b>13</b>
<b>1.7.</b>	<b>Aktivierung von kardialen Fibroblasten .....</b>	<b>14</b>
<b>1.8.</b>	<b>Mechanische Stimulation .....</b>	<b>15</b>
<b>1.9.</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>16</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.</b>	<b>Material.....</b>	<b>18</b>
2.1.1.	Zellkultur .....	18
2.1.2.	SDS-Page.....	19
2.1.3.	Lösungen .....	20
2.1.4.	Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.5.	Geräte.....	22
2.1.6.	Software.....	22
<b>2.2.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>23</b>
2.2.1.	Zellkultur .....	23
2.2.2.	Mechanische Stimulation .....	24
2.2.2.1.	Mechanische Dehnung auf Silikonelastomermatrix .....	24
2.2.2.2.	Mechanische Stimulation durch Variation der Untergrundsteifheit .....	25
2.2.3.	Biochemische Methoden .....	26
2.2.3.1.	Immunfluoreszenzfärbung .....	26
2.2.3.2.	RNA-Isolation.....	27

2.2.3.3. Reverse Transkription.....	27
2.2.3.4. Quantitative Echtzeit PCR.....	28
2.2.3.5. Protein-Isolation.....	31
2.2.3.6. Bestimmung der Proteinkonzentration .....	31
2.2.3.7. SDS-PAGE .....	31
2.2.3.8. Statistik .....	34
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1. Charakterisierung der kardialen Fibroblasten.....</b>	<b>35</b>
3.1.1. Charakterisierung der verwendeten Zellen anhand von Zellmarkern .....	35
3.1.2. Charakterisierung der kardialen Fibroblasten mittels Immunfluoreszenzfärbung.....	36
<b>3.2. Mechanische Stimulation durch Dehnung.....</b>	<b>37</b>
3.2.1. Veränderungen der Expression von Aktivierungsmarkern in kardialen Fibroblasten auf Transkriptionsebene durch mechanische Dehnung auf einer kollagenbeschichteten Matrix.....	38
3.2.2. Veränderungen der Expression von Aktivierungsmarkern in kardialen Fibroblasten auf Transkriptionsebene durch mechanische Dehnung auf einer lamininbeschichteten Matrix .....	41
3.2.3. Vergleich der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern auf Transkriptionsebene in Abhängigkeit der Beschichtung der Membran mit Kollagen oder Laminin .....	45
3.2.4. Veränderungen der Expression von osteogenen Markern in kardialen Fibroblasten auf Transkriptionsebene durch mechanische Dehnung auf einer kollagenbeschichteten Matrix.....	49
3.2.5. Veränderungen der Expression von osteogenen Markern in kardialen Fibroblasten auf Transkriptionsebene durch mechanische Dehnung auf einer lamininbeschichteten Matrix .....	52
3.2.6. Vergleich der Veränderung der Expression von osteogenen Markern auf Transkriptionsebene in Abhängigkeit der Beschichtung der Membran mit Kollagen oder Laminin .....	55
3.2.7. Veränderungen der Proteinexpression in kardialen Fibroblasten nach mechanischer Dehnung auf einer kollagenbeschichteten Matrix.....	58
3.2.8. Veränderungen der Proteinexpression in kardialen Fibroblasten nach mechanischer Dehnung auf einer lamininbeschichteten Matrix.....	62
<b>3.3. Mechanische Stimulation durch Steifheit des Untergrundes.....</b>	<b>66</b>
3.3.1. Morphologie der Zellen.....	66
3.3.2. Veränderung der Expression von kardialen Fibroblasten durch Variation der Steifheit des Untergrundes .....	67
3.3.2.1. Veränderungen der Expression von Aktivierungsmarkern in kardialen Fibroblasten auf Transkriptionsebene durch Variation der Steifheit des Untergrundes.....	68

3.3.2.2. Veränderungen der Expression von osteogenen Markern in kardialen Fibroblasten auf Transkriptionsebene durch Variation der Steifheit des Untergrundes.....	72
3.3.2.3. Veränderungen der Proteinexpression von Aktivierungsmarkern in kardialen Fibroblasten auf Translationssebene durch Variation der Steifheit des Untergrundes.....	76
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>78</b>
4.1. Molekulare Charakterisierung humaner kardialer Fibroblasten.....	78
4.2. Charakterisierung der kardialen Fibroblasten mittels Immunfluoreszenzfärbung.....	80
4.3. Mechanische Stimulation .....	80
4.3.1. Mechanische Stimulation durch Dehnung.....	83
4.3.2. Mechanische Stimulation durch Steifheit des Untergrundes.....	88
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>90</b>
<b>6. Summary .....</b>	<b>92</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>93</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>9. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>101</b>
<b>10. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>102</b>
<b>11. Ehrenwörtliche Erklärung.....</b>	<b>112</b>
<b>12. Danksagung.....</b>	<b>113</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Die Anatomie und Physiologie des kardio-pulmonalen Systems

Das Herz ist ein Hohlmuskel, der eingehüllt vom Herzbeutel zwischen den beiden Lungenflügeln im Thorax lokalisiert ist. In der Embryonalentwicklung entsteht es aus dem *Mesoderm*. Es verschmelzen zwei Endokardschläuche zu einem primitiven Herzschauch, der durch Faltung zur sogenannten Herzscheife wird. Durch die Ausbildung von Septen entsteht schließlich die spätere Herzstruktur (Wilting, 2010).

Das Herzgewicht liegt beim herzgesunden Menschen bei ungefähr 300g (Braun et al., 2018). Das Herzgewebe wird von verschiedenen Zellarten gebildet, neben Kardiomyozyten, die 70-80% des Gesamtvolumen des Herzens einnehmen und für die kontraktile Eigenschaften des Herzmuskels verantwortlich sind, findet man unter anderen Fibroblasten, Endothelzellen, Perizyten und Immunzellen im Herzgewebe. Diese sind an der Aufrechterhaltung einer funktionalen Organstruktur durch Produktion und Degradierung von EZM, interzellulärer Kommunikation und Versorgung des Gewebes essentiell beteiligt (Zhou & Pu, 2016). Das Herz kann in eine linke und eine rechte Hälfte unterteilt werden. Beide Hälften bestehen aus je einem Vorhof und einem Ventrikel, die durch Klappen voneinander getrennt sind. Der jeweilige Ventrikel ist über eine entsprechende Auswurfbahn, der linke Ventrikel über die Aorta, der rechte Ventrikel über den *Truncus pulmonalis* mit dem Körper- bzw. Lungenkreislauf verbunden.

Im Blutkreislauf dient das Herz als Pumpe, die in periodischen Abläufen aus Kontraktion und Dilatation das Blut in die Gefäße des Lungen- und Körperkreislaufes pumpt. Die Herzaktion wird über ein autonomes Erregungsleitungssystem gesteuert, Schrittmacher dieses Systems ist der Sinusknoten, der mit einer Frequenz von 60-70 Impulsen pro Minute durch spontane Depolarisation Aktionspotenziale generiert. Diese erregen das Vorhofmyokard und werden über verschiedene Stationen auf das Ventrikelmyokard übergeleitet (Braun et al., 2018; Behrends et al., 2012; Schünke et al., 2009).

Die Lunge liegt im Thorax umgeben von der Pleura. Embryologisch entsteht die Lunge aus dem Meso- und dem Endoderm. Ausgehend von der Laryngotrachealrinne entwickelt sich die Trachea mit ihren zwei Lungenknospen, die die Anlagen des rechten bzw. linken Lungenflügels bilden. Die Lungenknospen zweigen sich im Verlauf immer weiter auf und bilden den Bronchialbaum und schließlich die Alveolen (Wilting, 2010; Schünke et al., 2009).

Die Hauptbronchien, die von der Trachea abgehen, teilen sich rechts in drei bzw. links in zwei Lappenbronchien mit einem Durchmesser von 8-12 mm auf. Es folgt die Aufteilung in Segmentbronchien und schließlich in die Bronchioli, deren Durchmesser zwischen 0,5 und 0,8mm beträgt. Die Bronchialwand wird bis zur siebten dichotomen Aufzweigung der Luftwege aus Knorpel und glatter Muskulatur gebildet, nach der siebten Aufteilung ist kein Knorpel mehr am Wandaufbau beteiligt. Die Bronchioli versorgen insgesamt ca. 300 Millionen Alveolen mit einer Gesamtoberfläche von 50 m<sup>2</sup>, an der der Gasaustausch stattfindet (Braun et al., 2018).

Während das linke Herz das sauerstoffangereicherte Blut über die Aorta in den Körperkreislauf pumpt und dort Muskulatur und Organe mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt, ist dem rechten Herz der Lungenkreislauf nachgeschaltet. Die Aa. Pulmonales zweigen sich entlang des Bronchialbaumes auf und bilden schließlich ein Kapillarnetz um die Alveolen. Die Wand der Kapillare besteht nur aus einer Schicht Endothelzellen, wodurch ein enger Kontakt zwischen Blutgefäßen und Alveolen gewährleistet wird. Dies ermöglicht den Austausch von überschüssigem CO<sub>2</sub>, welches bei Stoffwechselfvorgängen im Körper entsteht, in die Atmosphäre und die Aufnahme von O<sub>2</sub> aus der Atemluft in das Blut. Dieser Austausch erfolgt nach dem Prinzip der Diffusion entlang der Gradienten zwischen den Partialdrücken in Alveolar- und Gefäßlumen (Behrends et al., 2012).

Beim Lungenkreislauf handelt es sich um ein Niederdrucksystem, das durch einen niedrigen Druck von unter 20mmHg, einen geringen Gefäßwiderstand und eine hohe Blutflussgeschwindigkeit ausgezeichnet wird. Diese Eigenschaften werden durch die Regulation und Struktur der Gefäße gewährleistet. Während Arterien im Körperkreislauf eine ausgeprägte Muskelschicht aufweisen, kommen glatte Muskelzellen in den arteriellen Gefäßen des Lungenkreislaufes in geringerer Anzahl vor. Zusätzlich werden große Mengen endogener Vasodilatoren gebildet, während die Produktion endogener Vasokonstriktoren sehr niedrig ist. (Behrends et al., 2012; Suresh & Shimoda, 2016).

Auch die Regulation der Gefäße unterscheidet sich zwischen systemischem und pulmonalem Kreislauf. Während es im systemischen Kreislauf bei einer Hypoxie von Gewebe zu einer Vasodilatation kommt, um das Gewebe besser zu versorgen, kommt es im pulmonalen Kreislauf zu einer Vasokonstriktion der Gefäße in schlecht ventilerten Arealen der Lunge, die dadurch weniger durchblutet werden. Durch den sogenannten Euler-Liljestrand-Reflex wird damit das Verhältnis von Ventilation und Perfusion konstant gehalten. Ein weiterer Unterschied ist der Mechanismus der druckpassiven

Rekrutierung apikaler Gefäße, wenn es zu einem Druckanstieg in den Kapillaren kommt (Pape et al., 2019).

## 1.2. Pulmonale Hypertonie

Das Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie (PH) bezeichnet einen Anstieg des Widerstandes in pulmonalen Gefäßen, wodurch es zu einer Belastung des rechten Ventrikels des Herzens kommt. Unbehandelt verläuft die Erkrankung tödlich. Die hämodynamische Definition der PH beruht auf verschiedenen Parametern, die durch eine Rechtsherzkatheteruntersuchung ermittelt werden können. Bereits seit dem Weltsymposium über Pulmonale Hypertonie (WSPH) in 1973, wird eine Erhöhung des mittleren Pulmonalarteriendrucks (mPAP) als zentraler Parameter in der Diagnostik der PH eingesetzt. Der Grenzwert liegt bei einer Steigerung des mPAP von physiologisch  $14 \pm 3,3$  mmHg auf über 20 mmHg. Der mPAP ist dabei ein Produkt aus der Auswurfleistung des Herzens und dem pulmonalen Gefäßwiderstand.

Seit dem 6. WSPH im Jahr 2018 werden zusätzlich die Parameter „pulmonaler kapillärer Verschlussdruck“ und „pulmonaler Gefäßwiderstand“ in die Definition miteinbezogen, um eine differenziertere Unterscheidung der PH in präkapilläre PH, isolierte postkapilläre PH oder kombinierte prä- und postkapilläre PH vornehmen zu können (Opitz, 2016; Condon et al., 2019).

Tabelle 1: Hämodynamische Profile der pulmonalen Hypertonie (Condon et al. 2019)

<b>Klassifikation</b>	<b>Mittlerer Pulmonalarteriendruck</b>	<b>Pulmonal kapillärer Verschlussdruck</b>	<b>Pulmonaler Gefäßwiderstand</b>
Isolierte präkapilläre PH	>20 mmHg	<15 mmHg	>3 WU
Kombinierte prä- und postkapilläre PH	>20 mmHg	>15 mmHg	>3 WU
Isolierte postkapilläre PH	>20 mmHg	>15 mmHg	>3 WU

Die Ursachen für die chronische Form der pulmonalen Hypertonie sind hierbei sehr unterschiedlich. 2013 wurden die Ursachen in der Nizza-Klassifikation definiert und auf dem 6. WSPH überarbeitet:

Tabelle 2: Klassifikation der pulmonalen Hypertonie nach der Nizzakonferenz 2013, überarbeitet auf dem 6. WSPH 2018 (Herold, 2018; Simonneau et al., 2019)

## **1. Pulmonal-arterielle Hypertonie**

- 1.1. Ideopathische PAH (IPAH)
- 1.2. Hereditäre PAH (HPAH)
- 1.3. PAH assoziiert mit Medikamenten, Toxinen, Drogen
- 1.4. PAH assoziiert (PAAH) mit
  - Bindegewebserkrankungen
  - HIV-Infektionen
  - portaler Hypertension
  - angeborenen Herfehlern
  - Schistomiasis
- 1.5. PAH mit langfristigem Ansprechen auf Kalziumkanalblocker
- 1.6. Pulmonale venookklusive Erkrankungen und/oder pulmonale kapilläre Hämangiomatose
- 1.7. Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen (PPHN)

## **2. Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankungen**

- 2.1. PH bei Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventikulärer Ejektionsfraktion
- 2.2. PH bei Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventikulärer Ejektionsfraktion
- 2.3. Klappenerkrankungen
- 2.4. Angeborene/erworbene Obstruktion des Linksherz-Ausflustraktes und angeborene Kardiomyopathien

## **3. Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankungen und/oder Hypoxämie**

- 3.1. Obstruktive Lungenerkrankungen
- 3.2. Restriktive Lungenerkrankungen
- 3.3. Andere Lungenerkrankungen mit gemischten restriktiv-obstruktiven Muster
- 3.4. Hypoxie ohne Lungenerkrankung
- 3.5. Entwicklungsbedingte Lungenerkrankungen

## **4. Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)**

- 4.1. Chronische thromboembolische PH
- 4.2. Andere Obstruktionen der Pulmonalarterien

## **5. Pulmonale Hypertonie unklarer oder multifaktorieller Genese**

- 5.1. Hämatologische Erkrankungen
- 5.2. Systemische und metabolische Erkrankungen
- 5.3. Andere Erkrankungen
- 5.4. Komplexe angeborene Herzerkrankungen

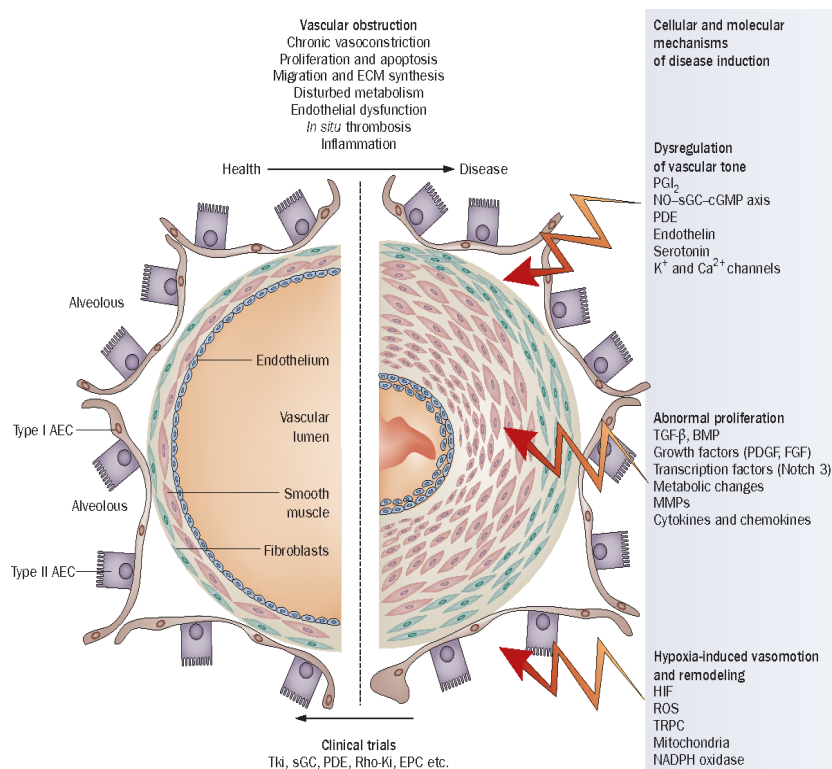
### 1.2.1. Pulmonale arterielle Hypertonie

Eine Unterform der PH ist die Pulmonale arterielle Hypertonie (PAH). PAH ist eine lebensbedrohliche und unheilbare Erkrankung mit einer Prävalenz zwischen 12-15 Fällen pro einer Millionen Erwachsenen. Die 5-Jahres Überlebensrate beträgt circa 65% (Benza et al., 2012; Lai et al., 2014). Die Ursachen von PAH sind vielfältig. Häufig handelt es sich um eine idiopathische Genese, eine spontane Mutation oder den Erwerb einer PAH als sekundäres Krankheitsbild (Lai et al., 2014).

Bei der PAH kommt es durch strukturelle Umbauprozesse zu einer Verdickung der pulmonal-vaskulären Gefäßwand. Vermehrte Proliferation, verringerte Apoptose und erhöhte Migrationseigenschaften glatter Muskelzellen spielen dabei eine entscheidende Rolle. Dysfunktion von Endothelzellen und gesteigerte Kontraktion von glatten Muskelzellen tragen zusätzlich zur Verengung von kleinen Arteriolen der Lunge bei. Die verdickte Gefäßwand mit einem daraus resultierenden eingeengten Gefäßlumen, führt zu einem erhöhten Widerstand für den Blutfluss, wodurch der mittlere Pulmonalarteriendruck (mPAP) auf über 20 mmHg ansteigt (Lai et al., 2014). Hinzu kommt die erhöhte Produktion von extrazellulärer Matrix, die zusätzlich zu einer Verengung und Einschränkung der Elastizität der Blutgefäße führt (Rabinovitch, 2012).

Durch die Erhöhung des Widerstandes in den pulmonalen Blutgefäßen wird die Nachlast des rechten Ventrikels erhöht. Dieser ist unter physiologischen Bedingungen dafür ausgelegt, Blut mit einer hohen Durchflussrate in ein Niederdrucksystem zu pumpen, damit das Blut innerhalb einer kurzen Zeitspanne mit Sauerstoff angereichert werden kann. Um das Schlagvolumen und damit die Durchflussrate trotz höherem Widerstand konstant aufrecht erhalten zu können, reagiert der Körper zu Beginn der Erkrankung mit einer Steigerung der Kontraktilität der Muskulatur des rechten Ventrikels. Dies wird durch Hypertrophie der Herzmuskulatur und eine Veränderung der Muskeleigenschaften erreicht. Man spricht von einer adaptiven Hypertrophie. Dieser Status kann über Jahre anhalten. Bei Fortschreiten der Erkrankung, wird der Prozess der Hypertrophie unterbrochen und die Herzkammer beginnt zu dilatieren. Man spricht dann von einem chronischen *Cor pulmonale* (Braun et al., 2018; Vonk Noordegraf et al., 2017). Die Mechanismen, die zur Maladaptation des rechten Ventrikels bei erhöhter Druckbelastung beitragen sind vielfältig. Vermehrt reaktive Sauerstoffspezies und neurohumorale Aktivierung tragen dazu bei, dass es zu einer Dysfunktion des rechten Ventrikels kommt

(Vonk Noordegraaf et al., 2013). Die Dilatation des Herzmuskels führt zu einer Erhöhung der Wandspannung und einem erhöhten Druck in der Herzkammer. Eine vermehrte Fibrose verstärkt diesen Effekt. Dieser Stress führt zu strukturellen und funktionellen Veränderungen von Kardiomyozyten, damit verbunden ist ein erhöhter Energiebedarf der Herzmuskelzellen. Deshalb wechselt der Organismus zur Energiegewinnung von oxidativer Phosphorylierung auf vermehrte Glykolyse (Vonk Noordegraaf et al., 2017; Rich, 2012; Ren et al., 2019).



**Abbildung 1: Vaskuläres Remodelling bei pulmonaler Hypertension (Schermuly et al., 2011)**

Durch chronische Vasokonstriktion kommt es zur vaskulären Obstruktion bedingt durch diverse zelluläre und molekulare Mechanismen mit verschiedenen Botenstoffen. Dazu zählen die Dysregulation des vaskulären Tonus, abnormale Zellproliferation und Hypoxie induzierte Bewegung von Gefäßen und Remodelling.

### 1.2.2. Symptome

Die PAH zeigt eine unspezifische Symptomatik, die Symptome werden zum überwiegenden Teil durch eine eingeschränkte Rechtsherzfunktion bedingt. Dazu gehören Kurzatmigkeit, vor allem bei Belastung, abnehmende Leistungsfähigkeit und rasche Ermüdung, Herzrhythmusstörungen, Schwindel, Zyanose und Brustschmerz.

Hinzu kommen im weiteren Verlauf die Symptome einer dekompensierten Rechtsherzinsuffizienz wie Ödeme, Aszites und Halsvenenstauung (Herold, 2018).

### 1.2.3. Klassifikation

Der funktionelle Status von Patienten mit PAH wird anhand der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation eingeteilt.

Tabelle 3: Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation zur Einschätzung des funktionellen Status von Patienten mit PAH (Deutsche Gesellschaft für Kardiologie e.V., 2022)

<b>WHO-FC I</b>	Patienten mit pulmonaler Hypertonie ohne daraus resultierende Einschränkung der körperlichen Aktivität. Gewöhnliche körperliche Aktivität verursacht keine übermäßige Dyspnoe oder Müdigkeit, Brustschmerzen oder Beinahe-Synkopen,
<b>WHO-FC II</b>	Patienten mit pulmonaler Hypertonie, die in ihrer körperlichen Aktivität leicht eingeschränkt sind. Sie fühlen sich in Ruhe wohl. Gewöhnliche körperliche Aktivität verursacht übermäßige Dyspnoe oder Müdigkeit, Brustschmerzen oder Beinahe-Synkopen.
<b>WHO-FC III</b>	Patienten mit pulmonaler Hypertonie, die in ihrer körperlichen Aktivität stark eingeschränkt sind. Sie fühlen sich in Ruhe wohl. Weniger als gewöhnliche Aktivität führt zu übermäßiger Dyspnoe oder Müdigkeit, Brustschmerzen oder Beinahe-Synkopen.
<b>WHO-FC IV</b>	Patienten mit pulmonaler Hypertonie, die nicht in der Lage sind, eine körperliche Tätigkeit ohne Symptome auszuüben. Diese Patienten weisen Zeichen einer Rechtsherzinsuffizienz auf. Dyspnoe und/oder Müdigkeit können sogar im Ruhezustand auftreten. Die Beschwerden werden durch jedwede körperliche Aktivität verstärkt.

### 1.2.4. Therapie

Die Therapie der pulmonalen arteriellen Hypertonie erfolgt auf Grundlage der Einstufung in Risikogruppen hinsichtlich der 1-Jahresmortalität. Es erfolgt die Einteilung in niedriges, mittleres und hohes Risiko, hierfür werden Symptome und Untersuchungsergebnisse herangezogen. Die Therapie ergibt sich durch eine Kombination aus verschiedenen Maßnahmen, die in drei Schritte aufgeteilt werden.

Der erste Schritt beinhaltet allgemeine Maßnahmen und supportive Therapien. Allgemeine Maßnahmen umfassen die Vermeidung einer Schwangerschaft durch Kontrazeption, da eine Schwangerschaft mit den verbundenen Veränderungen in der Hämodynamik und im Hormonhaushalt ein sehr hohes Risiko für die betroffenen Patientinnen darstellen würde (Montani et al., 2013). Zusätzlich sollten die Patienten ein ihnen angepasstes körperliches Training absolvieren und zur Prävention von Infektionserkrankungen gegen Pneumokokken, Influenza und SARS-CoV-2 geimpft werden (Deutsche Gesellschaft für Kardiologie e.V. 2022). Als supportive Therapie gilt die Gabe von Diuretika, um die Symptome der Rechtsherzinsuffizienz zu verbessern und Flüssigkeitsretentionen zu verringern. Die dauerhafte Gabe von Sauerstoff sollte ab einem Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut von dauerhaft unter 60 mmHg erfolgen. Des Weiteren sollten eine Antikoagulation zur Vermeidung von Thrombosen und Embolien und der Ausgleich von Anämien und Eisenmangel angestrebt werden (Foris et al., 2017).

Im zweiten Schritt folgt die gezielte Therapie der pulmonalen Hypertonie. Hierfür sind verschiedene Substanzklassen zugelassen. Im Folgenden werden die verschiedenen Angriffspunkte der gezielten Therapie erläutert. Die Auswahl der verwendeten Substanzklassen ist für jeden Patienten individuell.

#### **1.2.4.1. Kalziumantagonist**

Patienten, die ein sofortiges positives Ansprechen auf die Gabe von Vasodilatoren in der Herzkatheteruntersuchung zeigen, sollte eine hohe Konzentrationen an Kalziumantagonisten verabreicht werden. Diese sogenannte Vasoreaktivität wird bei der Rechtsherzkatheteruntersuchung durch die Gabe kurzwirksamer Vasodilatoren getestet. Etwa 5% der an PAH erkrankten Patienten sprechen auf Kalziumantagonisten an. Durch die Blockierung von Calciumkanäle wird eine Vasodilatation erreicht, weil Calcium nicht mehr in die glatten Muskelzellen der Gefäßwand einströmen kann und so eine Kontraktion verhindert wird (Montani et al., 2013).

#### **1.2.4.2. Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (ERA)**

Endothelin-1 nimmt eine wichtige Rolle in der Modulation des Gefäßtonus ein. Je nach Rezeptortyp und Zielzelle, an den das Endothelin-1 bindet, unterscheidet sich dessen Wirkung. Auf glatten Muskelzellen findet man den Endothelin Rezeptor A (ETRA) und

den Endothelinrezeptor B (ETRB), die Aktivierung dieser führt über Signalkaskaden zur Vasokonstriktion. Bindet Endothelin-1 am ETRB auf Endothelzellen, wird dadurch die Produktion von Stickstoffmonoxid und Prostacyclinen gesteigert und in der Konsequenz der Vasotonus gesenkt, es kommt zur Vasodilatation. Eine weitere Aufgabe von Endothelin-1 ist die positive Wirkung auf die Proliferation von glatten Muskelzellen (Channik et al., 2004).

In der Klinik kommen sowohl selektive ETRA-Antagonisten als auch Präparate, die kumulativ ETRA und ETRB binden und inhibieren, zum Einsatz (Montani et al., 2013).

#### **1.2.4.3. sGC-Stimulator**

Die lösliche Guanylatcyclase befindet sich im Zytoplasma von glatten Muskelzellen in der Gefäßwand. Diffundiert Stickstoffmonoxid in die Zelle, so wird die Guanylatcyclase aktiviert und die Umwandlung von Guanosin-5'-triphosphat in zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) katalysiert. cGMP wiederum wirkt über mehrere Zielproteine, was unter anderem zu einer Vasodilatation führt. Das in der Behandlung der PAH eingesetzte Präparat Riociguat wirkt über die direkte Stimulation der löslichen Guanylatzyklase unabhängig von NO und zusätzlich über eine Erhöhung der Sensitivität der Guanylatzyklase für NO (Lian et al., 2017).

#### **1.2.4.4. Phosphodiesterase-5-Inhibitoren**

Das Enzym Phosphodiesterase-5 führt zu einem Abbau von cGMP. Sildenafil und Tadalafil sind Präparate, die über eine Hemmung der PDE-5 wirken, wodurch cGMP nicht mehr abgebaut wird. Folglich steigt der cGMP-Spiegel, was zu einer verstärkten Vasodilatation führt (Buckley et al., 2010).

#### **1.2.4.5. Prostacyclin-Agonisten und Prostacyclinrezeptor-Agonisten**

Physiologisch wird Prostacyclin, ein Vertreter der Eicosanoide, von Endothelzellen gebildet. Es bewirkt eine Vasodilatation, zusätzlich verhindert es die Aggregation von Thrombozyten und wirkt sowohl zellprotektiv als auch antiproliferativ. Dabei wirkt es über die Aktivierung des IP-Rezeptors, einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der die Adenylatcyclase aktiviert. Der cAMP-Spiegel wird durch die Aktivierung erhöht, es kommt zu einer Relaxation von glatten Muskelzellen sowie einer verminderten Proliferation. Es existieren mehrere Wirkstoffe, die im klinischen Alltag Anwendung finden, darunter Iloprost, Epoprostenol und Treprostinil, die sich in Ihrer

Applikationsform unterscheiden. Durch die Entwicklung oraler Präparate wurde das klinische Management im Vergleich zu i.v. Präparaten stark erleichtert (Olschewski et al., 2004; Del Pozo et al., 2017).

Je nach Ansprechen auf die gezielte Therapie, sollte in Schritt drei eine Lungentransplantation in Betracht gezogen werden (Deutsche Gesellschaft für Kardiologie e.V. 2022)

### **1.3. Therapie des akuten Rechtsherzversagens**

Kommt es im Verlauf der Erkrankung zu einer Dekompensation der Rechtsherzinsuffizienz mit peripheren Ödemen, Aszites und Halsvenenstauung, sollte in der Therapie das Volumenmanagement im Vordergrund stehen. Dabei sollte beachtet werden, dass die Funktion des rechten Ventrikels stark durch Volumenschwankungen beeinflusst wird, weshalb eine Balance von optimaler Vorlast und reduzierter Nachlast angestrebt wird. Neben einer vorsichtigen Volumengabe unter ständigem hämodynamischem Monitoring, sollten die Gabe von Vasopressoren und selektiven pulmonalen Vasodilatoren erfolgen. Um eine weitere Erhöhung der Nachlast durch hypoxische Vasokonstriktion der Lungengefäße zu vermeiden, sollte eine Oxygenierung von mindestens 92% angestrebt werden. Das rechte Herz sollte zusätzlich durch Diuretikagabe entlastet werden (Wetsch et al., 2011; Meyer et al., 2008).

## 1.4. Kardiale Fibroblasten

Das humane Herz besteht aus verschiedenen Zelltypen. Neben Muskelzellen, den sogenannten Kardiomyozyten, die flächenmäßig den größten Teil des Organs darstellen, sind Endothelzellen und Fibroblasten die zahlenmäßig dominanten Zellen im Herzgewebe.

Fibroblasten sind längliche Zellen mesenchymalen Ursprungs mit langen Ausläufern, auffällig ist ihr spindelförmiger Kern, zudem sind Golgiapparat und endoplasmatisches Retikulum prominent ausgeprägt (Baudino et al., 2006; Goldsmith et al., 2014; Lüllmann-Rauch & Asan, 2015). Die Herkunft von Fibroblasten weist eine große Heterogenität auf, die funktionellen Konsequenzen der unterschiedlichen Abstammungen sind jedoch weitestgehend unbekannt. Dabei bilden Fibrozyten, Endothelzellen, Zellen des Epikards, Monozyten und zirkulierende Progenitorzellen aus dem Knochenmark die Gruppe der Vorläuferzellen. Studien zeigen, dass in Mäuseherzen der größte Anteil an kardialen Fibroblasten von Zellen des Proepikardiums abstammt, die durch epithel-zu-mesenchymaler Transformation zu kardialen Fibroblasten werden (Ali et al., 2014; Krenning et al., 2010; Snider et al., 2009).

Fibroblasten sind maßgeblich für den Aufbau, den Abbau und die Aufrechterhaltung der Extrazellulären Matrix (EZM) verantwortlich. Diese stützt den Ventrikel strukturell und reguliert gezielt Signalwege. Dabei synthetisieren Fibroblasten unter anderem mehrere Strukturproteine wie unterschiedliche Kollagenformen oder Fibronectin. Darüber hinaus üben sie durch die Produktion von Wachstumsfaktoren und über direkte mechanische Verbindungen mit anderen Zellarten Einfluss auf deren Morphogenese aus (Chiquet, 1999). Über weitere Signalproteine wie Connexine und Cadherine sind die kardialen Fibroblasten untereinander verbunden, über Integrine bilden sie ein Synzytium mit der EZM und über Connexin45 mit Myozyten (Snider et al., 2009).

Je nach Gewebe in dem die Fibroblasten zu finden sind und die äußeren Bedingungen, die auf sie einwirken, variiert der Phänotyp von der Fibroblasten und damit die Zusammensetzung der von ihnen produzierten EZM. Im Herzen bildet die EZM ein dreidimensionales Netzwerk, in dem die Kardiomyozyten eingebettet sind und so die Ausrichtung dieser mitbestimmt. Damit sorgt die EZM für eine strukturelle Integrität. Des Weiteren sorgt die EZM für eine elektrische Isolierung von Vorhöfen und Ventrikeln, um eine korrekt ablaufende Kontraktion des Herzmuskels zu ermöglichen (Krenning et

al., 2010). Die Zusammensetzung und Organisation der EZM ist variabel, wodurch es dem Herzen ermöglicht wird, sich an chemische, mechanische oder elektrische Signale anzupassen. Dies ist vor allem während der Entwicklung, aber auch bei Hypertrophie oder Dilatation als Reaktion auf sich verändernde mechanische Belastung von Bedeutung.

Die Sekretion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und anderen Signalmolekülen wirkt autokrin oder parakrin auf Fibroblasten und andere Zelltypen des Herzens. So tragen Fibroblasten zur Angiogenese bei, gleichzeitig wirken andere Faktoren antiangiogenetisch. Hierdurch kommt den Fibroblasten eine wichtige Rolle in der Homöostase von kardialen Gefäßen zu. Durch die Interaktion mit Zellen des Immunsystems haben Fibroblasten außerdem Einfluss auf die Immunantwort und die Regeneration von Gewebe (Fu et al., 2018).

## **1.5. Aufbau und Funktion der Extrazellulären Matrix**

Die EZM bildet eine funktionelle Struktur, welche Zellzwischenräume füllt und sowohl strukturgebende als auch Aufgaben in der Signalweiterleitung übernimmt. Als Gesamtes trägt sie insbesondere zur Organisation und Struktur von Geweben bei und ist wichtig für die Regulation und Integration von Zellsignalen.

Der Großteil der EZM im Herzen wird von Kollagen Typ 1 und 3 gebildet, außerdem sind Glykoproteine wie Fibronectin und Bestandteile von Basalmembranen wie Laminin und Kollagen Typ 4 am Aufbau der EZM beteiligt. Sie geben der EZM ihre Struktur. Die verschiedenen Proteine binden an Zellrezeptoren wie Integrine. Diese Bindung führt zur Adhäsion, außerdem werden so Signale für das Zellüberleben, die Proliferation und die De-differenzierung weitergeleitet. Auch Wachstumsfaktoren dienen als Bindungspartner der EZM-Bestandteile, ihre Wirkung wird dadurch beeinflusst.

Neben den Proteinen, die an der Strukturierung beteiligten sind, gibt es in der EZM sogenannte matrizelluläre Proteine, die mit Zelloberflächenrezeptoren, Wachstumsfaktoren und den Strukturproteinen interagieren. Sie spielen eine wichtige Rolle bei Signalweiterleitungskaskaden (Frangogiannis, 2012).

Die kardiale EZM nimmt über biochemische und mechanische Signale Einfluss auf Aktivierung, Migration und Proliferation von kardialen Fibroblasten. Die Interaktion zwischen EZM und Fibroblasten verläuft dabei über Integrine und DDRs (Discoidin

Domain Receptors). Integrine sind transmembranöse Proteine bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Einheit, die das Zytoskelett und den Extrazellulärraum miteinander verbinden und zudem eine wichtige Rolle in interzellulären Adhäsionsverbindungen spielen (Hynes, 2002). Integrine befinden sich an der Zelloberfläche und verbinden die EZM mit der Zelle. Gleichzeitig stehen sie in Interaktion mit Proteinen der fokalen Adhäsionskomplexe (MacKenna et al., 1998).

Studien zeigten, dass  $\alpha1\beta1$ ,  $\alpha2\beta1$ ,  $\alpha3\beta1$ ,  $\alpha10\beta1$  und  $\alpha11\beta1$  Integrine eine wichtige Rolle in der Interaktion von Kollagenen mit Fibroblasten spielten.  $\alpha1\beta1$  bindet außerdem die Strukturproteine Laminin und Fibronectin, die wichtig für eine gesteigerte aSMA-Synthese und damit für die Aktivierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten mitverantwortlich sind.  $\alpha2\beta1$  scheint den MAP Kinase Signalweg zu aktivieren. Über Integrine kann zudem auch latentes TGF- $\beta$  direkt aktiviert werden. *Discoidin Domain Receptors* (DDR1 und DDR2) werden von Fibroblasten exprimiert und binden an Kollagenmoleküle (Goldsmith et al. 2014; Eckes et al., 2000; Fan et al., 2012).

## **1.6. Strukturelle und funktionelle Veränderungen des Herzmuskels**

Kommt es durch pathologische Vorgänge zum Absterben von Herzmuskelgewebe, kann dieses durch fibrotisches Gewebe in Form einer Narbe ersetzt werden. Dabei werden kardiale Fibroblasten aktiviert und produzieren vermehrt fibrotisches Gewebe. Dieses hat durch einen höheren Anteil von EZM und den Verlust kontraktiler Zellen eine erhöhte mechanische Steifheit im Vergleich zu gesundem Herzgewebe. Je nach Größe und Lokalisation des Defektes kann dies zu Auswirkungen auf die Physiologie des Herzens führen. Dabei können die Druckverhältnisse zwischen Vorhof und Kammer verändert werden, die passive Füllung des Ventrikels während der Diastole wird erschwert, wodurch es zu diastolischen Dysfunktionen kommen kann. Bei stärkerer Zunahme der Steifheit des Herzmuskels kann es auch zu einer systolischen Dysfunktion kommen, der Auswurf von Blut in den jeweiligen Kreislauf wird gestört. Der Herzmuskel versucht dies durch eine Hypertrophie der Kardiomyozyten im verbleibenden Herzmuskel zu kompensieren. Neben dem Ersatz abgestorbenen Herzmuskelgewebes findet zudem die Bildung von fibrotischem Gewebe um intrakoronare Gefäße statt, die sogenannte perivaskuläre Fibrose. Durch diese wird der Gasaustausch in der Peripherie erschwert,

es kommt zu einer geringeren Sauerstoffversorgung der Kardiomyozyten. Das Risiko für eine koronare Ischämie steigt (Burlaw & Weber, 2002).

Neben der quantitativen Veränderung der EZM wird zusätzlich eine diskordante Zusammensetzung und Verknüpfung einzelner EZM-Komponenten beschrieben. Dieses Bild der EZM-Umstrukturierung wird auch als fibrotisches *remodeling* bezeichnet.

In der Literatur wird derzeit diskutiert, ob – insbesondere im rechten Ventrikel des Herzens - die Akkumulation von EZM einen Einfluss auf die Herzfunktion hat. Spekuliert wird, dass dadurch die Kontraktilität und Relaxation des Ventrikels verringert wird. Hinzu kommt, dass möglicherweise die Gewebeversorgung mit Nährstoffen sowie die elektrische Kopplung des kontrahierenden Gewebes gestört ist (Krenning et al., 2010; Davis & Molkentin, 2014).

## **1.7. Aktivierung von kardialen Fibroblasten**

Wird der Herzmuskel beispielsweise durch Druck-, Volumenbelastung oder durch Ischämie abnorm beansprucht, erfolgt eine biochemische Aktivierung im Gewebe residierender interstitieller Fibroblasten zu Myofibroblasten. Diese Aktivierung verläuft in zwei Phasen. In Phase eins werden Fibroblasten zu Proto-Myofibroblasten, welche durch zytoplasmatische Aktinstressfasern gekennzeichnet sind und in das betroffene Gewebe einwandern, um dort mit der Sekretion von EZM zu beginnen. Die zweite Phase wird durch die Differenzierung von Proto-Myofibroblasten zu Myofibroblasten gekennzeichnet. Myofibroblasten exprimieren  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin, ein Protein, das zur Formation von Stressfasern beiträgt und damit den migratorischen, kontraktilen Zelltyp beschreibt. Die gesteigerte Produktion von EZM-Bestandteilen wie Periostin, Kollagen Typ 1 und Kollagen Typ 3 und EZM modifizierenden Enzymen durch aktivierte kardiale Fibroblasten steigert die myokardiale Steifheit. Dies führt zu einer Verschlechterung der Herzfunktion und trägt damit zur entstehenden Herzinsuffizienz bei (Davis & Molkentin, 2014; Souders et al., 2009; Biswas & Longmore, 2016).

In gesundem Herzgewebe lassen sich normalerweise keine Myofibroblasten nachweisen (Rog-Zielinska et al. 2016). Je nach auslösendem Stimulus verlieren die Myofibroblasten nach einer gewissen Zeit ihre Proliferationsfähigkeit und die Fähigkeit Stressfasern zu bilden. In diesem Differenzierungsstadium, in welchem die Zellen weiter EZM produzieren und ihr Transkriptionsprofil Ähnlichkeiten mit Osteoblasten und

Chondrozyten zeigt, werden die Fibroblasten auch als Matrifibrozyten beschrieben. Sie verbleiben in dem entstandenen fibrotischen Gewebe und tragen zu dessen Integrität bei (Fu et al. 2018).

Die Aktivierung von Fibroblasten in Myofibroblasten kann durch neurohormonelle Stimuli, Zytokine, Wachstumsfaktoren oder mechanische Stimuli erfolgen (Davis & Moltekin, 2014). Bekannt sind der Einfluss beispielsweise von Transforming Growth Factor (TGF) $\beta$ , von Angiotensin II und Endothelin-1 (Souders et al., 2009; van Putten et al, 2016).

## **1.8. Mechanische Stimulation**

Mechanische Stimuli sind essentiell für die Gesundheit und das Erhalten von biologischen Funktionen des menschlichen Körpers. Dabei beschreibt die Mechanik ein physikalisches Fachgebiet, das sich mit der Bewegung und der Einwirkung von physikalischen Kräften auf einen Körper beschäftigt (Antwerpes et al., 2013) Im menschlichen Körper kann Mechanik in vielen verschiedenen Systemen beobachtet werden.

Eine bedeutende Rolle spielen mechanische Einflüsse auch in der Funktionsweise des Herzens. In Richtung des Blutstroms entstehen Scherkräfte auf die Zellen des Endokards, die Einfluss auf die Genregulation der Zellen haben. Senkrecht zu den Scherkräften wirken zyklische Kräfte auf die gesamte Herzwand. (Poelmann et al., 2008).

Das menschliche Herz schlägt im Ruhezustand in der Minute durchschnittlich zwischen 60- und 80-mal. Dabei kontrahieren die Herzmuskelzellen und ziehen sich zusammen, wodurch die Zelloberfläche verringert wird. Kommt es in der Diastole zur Füllung der Ventrikel mit Blut, so vergrößert sich das Volumen des Ventrikels und die Herzwand wird passiv gedehnt. Die Dehnung betrifft nicht nur die Kardiomyozyten in der Herzwand, sondern auch Endothelzellen, am Herzaufbau beteiligte Fibroblasten und alle weiteren Zellen im Myokard (Pape et al., 2019).

Mechanische Dehnung von Zellen als Stimulus wurde bereits in verschiedenen Studien untersucht, dabei wurden verschiedene Arten von Zellen beobachtet. Zellen im Allgemeinen haben die Fähigkeit, die mechanischen Gegebenheiten ihrer Umwelt wahrzunehmen und darauf zu reagieren. Bei der jeweiligen Reaktion kann es sich um

Veränderungen von Adhäsion, Proliferation oder Morphologie handeln (Quinlan et al., 2011). Vor allem in der Entwicklung von in vitro hergestelltem Gewebe, nimmt mechanische Dehnung eine wichtige Rolle ein, um physiologischere Bedingungen zu ermöglichen und damit eine Anpassung der Strukturen zu erreichen. Dabei zeigte sich die Bedeutung der Amplitude und der Frequenz der Dehnung auf die Reaktion der Zellen, die mit einer vermehrten Kollagenexpression und vermehrter Proliferation reagierten (Berry et al., 2003; Morgan & Black, 2017).

Es ist bereits bekannt, dass Fibroblasten ihre Produktion von Extrazellulärer Matrix an die Veränderung von mechanischer Beanspruchung anpassen, so zum Beispiel bei Wundheilung oder Knochenumbau (Chiquet, 1999).

Eine andere Form der mechanischen Stimulation neben passiver Dehnung, kann durch das Wachsen der Zellen auf dreidimensionalen Kollagenmatrices erreicht werden. Dies ermöglicht es, die Bedingungen in vitro vergleichbar von in vivo-Geweben zu gestalten. Die Kollagenfibrillen, an denen sich die Zellen anheften, üben dabei mechanische Kräfte auf die Zellen aus. Dabei können die Zellen in die Matrixsubstanz eindringen und sich mit den Kollagenfibrillen verwirren, was zu einer Reorganisation der Matrix führt. Während der Reorganisation sendet die Matrix mechanisches Feedback an die Zellen zurück. Um die Auswirkungen der Steife des Untergrundes auf die Zellen zu untersuchen, kann die Steife variiert werden. Steifheit beschreibt in der Physik die Resistenz eines Stoffes gegenüber Deformationen durch Krafteinwirkungen. Je steifer ein Stoff, desto höher ist seine Resistenz und desto mehr Kraft muss aufgewendet werden, um die Form des Stoffes zu verändern (van Putten et al., 2016; Herum et al. 2010). Dabei entspricht eine Steifheit von 8-12 kPa der Steifheit von gesundem Herzgewebe, eine Steifheit von 50 kPa der von fibrotischem Myokard, das eine Steifheit zwischen 20 und 100 kDa aufweist, abhängig vom Krankheitsbild und der Progression der Myokardfibrose (Herum et al., 2017; Hinz, 2009).

## **1.9. Zielsetzung der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen von mechanischer Stimulation im zeitlichen Verlauf auf Genexpressions- und Proteinexpressionsebene humaner kardialer Fibroblasten zu untersuchen und somit den zeitlichen Verlauf der unterschiedlichen Differenzierungsstadien von Fibroblasten (residierender Fibroblast, Myofibroblast,

Matrifibrozyt) abzubilden. Dazu wurden zwei unterschiedliche, komplementäre Formen von mechanischer Stimulation verwendet. Der erste Versuchsaufbau wirkt durch zweidimensionale mechanische Dehnung durch Über- und Unterdruckgenerierung auf die kardialen Fibroblasten, der zweite Versuchsaufbau sollte die Auswirkungen verschiedener Untergrundsteifheiten simulieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Zellkultur

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Materialien für die Zellkultur

	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnummer</b>	<b>Lotnummer</b>
Humane kardiale Fibroblasten	Promocell, Heidelberg	C-12375	450Z014.1
Fibroblast Growth Medium 3 Kit	Promocell	C-23130	
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Sigma Life Science	D8537	RNB69030
CELLSTAR Zellkulturflasche mit Filterschraubverschluss	Greiner Bio one	658175	
Softwell6 Collagen 4 kPa	Matrigen	SW6-COL-4EA	
Softwell6 Collagen 12 kPa	Matrigen	SW6-COL-12EA	
Softwell6 Collagen 50 kPa	Matrigen	SW6-COL-50EA	
Culture Plate — Collagen Type I	BioFlex	BF-3001C	180518
Culture Plate — Laminin	BioFlex	BF-3001L	190124
RNeasy MiniKit (50)	Quiagen	74104	163014084
RLT-Buffer		1053394	160046763
Buffer-RW1		1053394	163011631
Buffer RPE		1018013	160049922
RIPA Lysis and Extraction Buffer	Thermo Scientific	89901	SC246333
0.5M EDTA Solution	Thermo Scientific	1861274	OF187029
Halt Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X)	Thermo Scientific	1861281	SJ254226
iScript cDNA Synthese Kit	Biorad	1708891	
iTaqUniversal SYBR Green Supermix	Biorad	1725124	L001752A

Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo scientific	23225	RH237553
-------------------------------	-------------------	-------	----------

## 2.1.2. SDS-Page

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Materialien SDS-Page

	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnummer</b>	<b>Lotnummer</b>
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamidstammlösung)	Roth	3029.1	057254700
TEMED	Roth	2367.3	046239027
Roti-Load 1	Rot	K929.1	079281139
Page Ruler Prestained Ladder	Thermo scientific	26616	00627819
Ammoniumpersulfat	Sigma Aldrich	A3678-25G	
Tris PUFFERAN	Carl Roth	4855.2	
Glycin PUFFERAN	Carl Roth	3908.2	
Methanol	Sigma Aldrich	32213-2.5L-M	
Tris Hydrochlorid PUFFERAN	Carl Roth	9090.3	
Grade GB003 Blotting Paper, sheet 15x20 cm	GE Healthcare Life Sciences	10427812	16914927
Transfermembran NC	Carl Roth	1YXN.1	
Milchpulver	Carl Roth	T145.3	
Restore Western Blot Stripping buffer	Thermo Scientific	21063	
Wasserstoffperoxid 30% (v/v)	Carl Roth	CP26.1	
Immobilon Forte Western HRP substrate	Merck	WBLUF0100	
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific	34096	

### 2.1.3. Lösungen

Tabelle 6: Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Puffer

10xTBS	200mM Tris PUFFERAN 1,5M NaCl	24,23g Tris PUFFERAN 87,66g NaCl Einstellen des pH-Werts auf 7,5 mit Tris Hydrochlorid Auffüllen mit diH2O auf 1L
1xTBS-T	20mM Tris PUFFERAN 150 mM NaCl 0,05% Tween-20	100 ml 10xTBS 900ml diH2O 500µl Tween-20
10x SDS	250mM Tris PUFFERAN 1,92 M Glycin 1% SDS	30,286g Tris PUFFERANS 144,134g Glycin 10g SDS Auffüllen mit vorgewärmtem diH2O auf 1L
Transferpuffer	20% Methanol 25 mM Tris PUFFERAN 192 mM Glycin 0,01 % SDS	200ml Methanol 3,03g Tris PUFFERAN 14,4g Glycin 1ml SDS
Blockierlösung	5% Milchpulver (fettarm)	5g Milchpulver 100ml TBS-T

#### 2.1.4. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnummer</b>	<b>Lotnummer</b>
Safe Seal Reaktionsgefäß 2ml	Sarstedt	72695500	0000/2156001
Reaktionsgefäß 1,5ml	Sarstedt	690001	8083811
Safe Seal Reaktionsgefäß 0,5ml	Sarstedt	72704	7081311
Pipettenspitzen 10µl	Sarstedt	701130	
Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt	70760012	0585/5254011
Pipettenspitzen 1000µl	Sarstedt	70762010	
Pipettenspitzen 300µl	Greiner bio one	738250	131860
Gelloader Pipettenspitzen 200µl	Sarstedt	701190100	
Filterpipettenspitzen 10µl	Greiner bio one	771261	
Filterpipettenspitzen 200µl	Nerbe plus	07-642-8300	193094
Filterpipettenspitzen 1000µl	Nerbe plus	07-693-8300	154232
Serologische Pipette 5ml	Greiner bio one	606107	F17093AF
Serologische Pipette 10ml	Greiner bio one	607107	F171235B
50ml Cellstar Tubes	Greiner bio one	227261	
15ml Cellstar Tubes	Greiner bio one	188271	
96-Well PCR-Platten	Peqlab, VWR	PEQL 82-0600- A	
PCR Plate Sealingfilm	Biorad	MSB1001	

## 2.1.5. Geräte

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Geräte

	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnummer</b>	<b>Lotnummer</b>
Pipetten Research Plus	Eppendorf	3123000020 3123000055 3124000121	
Pipetboy 2	Integra	155 105	
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Biorad	1703930	
Mini Protean Tetra System	Biorad	1658000EDU	
Kühlzentrifuge Micro Star 17R	VWR	521-1647P	
Inkubationsschüttler Thriller	PEQLAB, VWR		
Schüttler	Phoenix Instruments	RS-TR05	
Vortex Genie 2	Scientific industries	SI-0256	
PCR-Cycler	Agilent Technologies	Mx3000p	
Thermocycler	Biometra	050-800	
Chemostar Imager	Intas		

## 2.1.6. Software

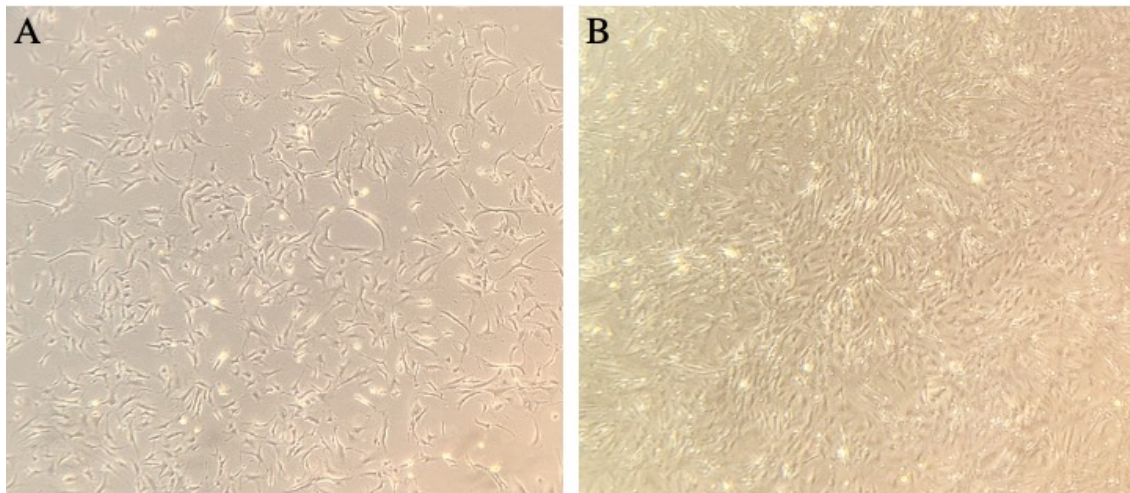
Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Software

ImageJ	National Institutes of Health
Graph Pad Prism 6	GraphPad Software
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation
Microsoft Word 2019	Microsoft Corporation
MxPro qPCR Software	Agilent

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Zellkultur**

Kommerziell erhältliche humane kardiale Fibroblasten der Firma Promocell wurden über 2 Passagen expandiert und in flüssigem Stickstoff gelagert. Für anstehende Experimente wurden Zellen aufgetaut und über 1-2 Passagen expandiert um ausreichende Zellnummern zu generieren. Dazu wurden die Zellen zunächst bei 37°C im Wasserbad für 2 Minuten aufgetaut und anschließend in 10 ml vorgewärmtes Nährmedium (human cardiac fibroblast growth medium, 10% FCS, 5µg/ml Insulin, 1ng/ml bFGF) aufgenommen. Die Kultivierung der humanen kardialen Fibroblasten erfolgte im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>, dabei wurde das Nährmedium nach 4 Stunden und daraufhin alle 48 Stunden gewechselt, um eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen und die Entsorgung von Stoffwechselprodukten zu ermöglichen. Betrug die Wachstumsdichte der Zellen 80-100%, wurden die Zellen mit einem Teilverhältnis von 1:3 aufgeteilt. Dazu wurde zunächst überschüssiges Medium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml vorgewärmter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, um Serumrückstände zu entfernen und anschließend mittels Trypsin (5ml) vom Zellkulturflaschenboden gelöst. Die Trypsininkubation (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) erfolgte für 5-7 Minuten bis sich optisch sichtbare Zellverbände voneinander getrennt hatten und Einzelzellen vorlagen. Das Trypsin wurde durch Zugabe des Serum-haltigen Nährmediums (10 ml) mit anschließender Zentrifugation (300 RPM, 10min) und Abnahme des Überstandes neutralisiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in Nährmedium (3ml) resuspendiert und die Zellen anschließend in drei mit jeweils 10 ml vorgewärmten Nährmedium gefüllte Zellkulturflaschen überführt. Das Medium wurde erneut alle 2-3 Tage gewechselt, bis die Wachstumsdichte der Zellen wieder bei 80-100% lag. Daraufhin wurden die Zellen wie oben beschrieben aus den Zellkulturflaschen abgelöst und anschließend entweder in Wachstumsmedium oder in Medium mit reduziertem Serumanteil (0,5 %, Starvation Medium) resuspendiert. Die Zellzahl wurde anschließend mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt und die jeweils benötigte Zellzahl in ein neues Kulturgefäß überführt.



**Abbildung 2: Mikroskopische Darstellung kardialer Fibroblasten in Zellkultur**

A nach 48 Stunden mit einer Zelldichte von ca. 20%

B nach 144 Stunden mit einer Zelldichte von ca. 95%

## 2.2.2. Mechanische Stimulation

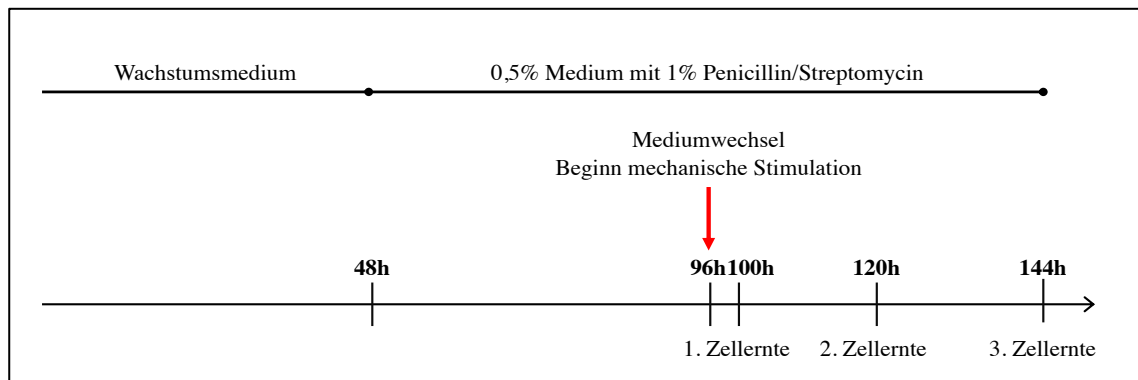
### 2.2.2.1. Mechanische Dehnung auf Silikonelastomermatrix

Für die mechanische Stimulierung wurden BioFlex Culture Plates der Firma Flexcell mit einer flexiblen Silikonelastomer-Membran verwendet. Dabei wurden zwei verschiedene Varianten mit unterschiedlicher Beschichtung verwendet. Die Membranen waren mit Kollagen-1 oder Laminin beschichtet.

In jede Kammer einer 6-Well-Platte wurden 100.000 Zellen/Well ausgesät. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, nach 48 Stunden wurde das Wachstumsmedium durch 2ml 0,5% Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin (*Starvation* Medium) ersetzt und die Zellen für weitere 48 Stunden inkubiert. Es folgte ein erneuter Mediumwechsel vor Beginn der Stimulation, hierbei wurde erneut *Starvation* Medium verwendet.

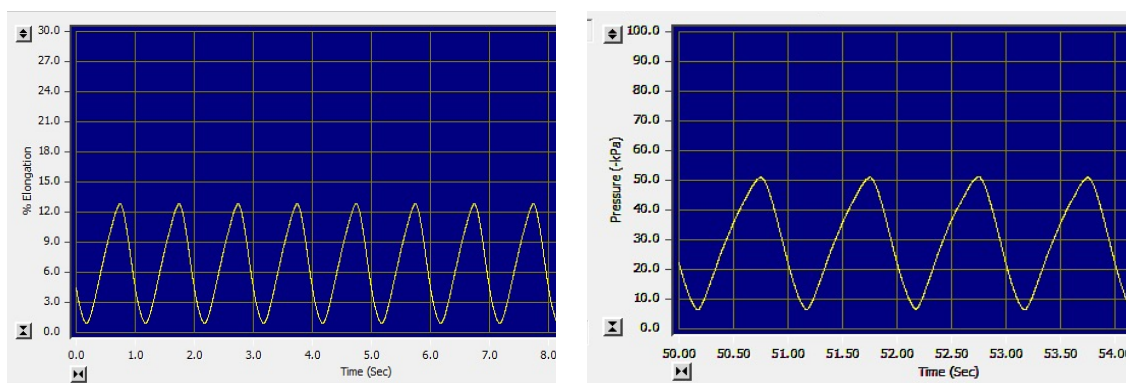
Um die Auswirkungen mechanischer Stimulation auf die Zellen zu untersuchen, wurden die 6-Well-Platten im FX-6000T Tension System der Firma Flexcell bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Dabei wurden die Zellen mit einer Frequenz von 1 Hz mittels Vakuum- und Überdruckgeneration um 12% elongiert (Abb. 3). Zur Kontrolle wurden weitere Zellen ohne mechanische Stimulation inkubiert. Die Zellen wurden 4, 24 und 48 Stunden nach Beginn der Stimulation geerntet. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und 2ml Trypsin LE in die Kammer gegeben und für 5 Minuten im Wärmeschrank inkubiert. Das Trypsin wurde mit den darin gelösten Zellen abgenommen und in ein Reaktionsgefäß gegeben und für 2 Minuten bei 12.000 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und

das Zellpellet je nach Versuchsaufbau weiterverwendet. Für die Ergebnisse wurden der Versuch zweimal wiederholt.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Stimulation mittels bi-axialer Dehnung**

Kultivierung der Zellen für 48 Stunden in Wachstumsmedium, nach 48 Stunden Wechsel des Mediums zu Starvation Medium, erneuter Mediumwechsel nach 96 Stunden und Beginn der mechanischen Stimulation mittels biaxialer Dehnung. Zellernten nach 100, 120 und 144 Stunden.



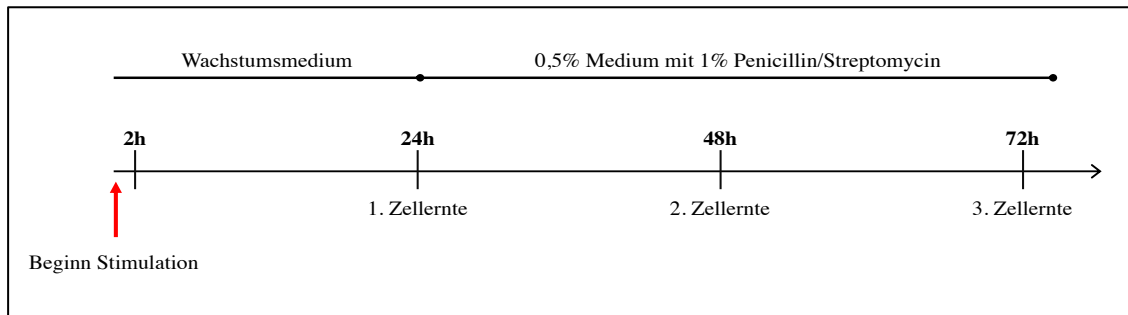
**Abbildung 4: programmierte Einstellung des Gerätes zur mechanischen Stimulation mittels bi-axialer Dehnung**

Durch Vakuum- und Überdruckgeneration wurden die Zellen mit einer Frequenz von 1Hz um 12% elongiert

### 2.2.2.2. Mechanische Stimulation durch Variation der Untergrundsteifheit

Um die Auswirkungen von unterschiedlicher Untergrundsteifheit auf kardiale Fibroblasten zu untersuchen, wurden die Zellen auf Platten der Firma Matrigen ausgesät, die mit einem Hydrogel beschichtet waren, das je nach Artikel eine Porengröße von 12kPa oder 50 kPa aufwies.

Hierfür wurden 2ml des Nährmediums in eine Kammer gegeben, die Zellen wurden mit einer Dichte von 100.000 Zellen/Well ausgesät. Nach 2 Stunden folgte ein Austausch des Mediums gegen 2 ml 0,5% Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die Zellen geerntet. Hierfür wurde das Medium abgesaugt, 2ml Accutase in die Kammer gegeben und im Wärmeschrank inkubiert, bis sich die Zellen vom Gel lösten. Die Inkubationszeit unterschied sich zwischen den verschiedenen Porengrößen. Anschließend wurden die 2ml der Accutase mit den darin gelösten Zellen abgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt und für 2 Minuten bei 12.000 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet je nach Versuchsaufbau weiterverwendet.



**Abbildung 5:**Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Stimulation mittels variabler Untergrundsteifheit

Beginn der Stimulation zum Zeitpunkt 0 mit Aussaat der Zellen auf die mit Hydrogel beschichteten Platten, Wechsel des Mediums zu Starvation-Medium nach 2 Stunden. Zellernten nach 24, 48 und 72 Stunden.

## 2.2.3. Biochemische Methoden

### 2.2.3.1. Immunfluoreszenzfärbung

Um die Identität und Morphologie der Zellen unter dem Mikroskop beurteilen zu können, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit vorgewärmtem PBS gespült. Für die Fixierung wurden 2ml 4% Paraformaldehyd für 15 Minuten auf Eis auf die Zellen appliziert. Es folgten drei Waschschrte à 5 Minuten mit jeweils 2ml PBS. Die Zellen wurden in einer Lösung aus Blockierungslösung (DPBS, 0,5% TritonX-100, 3%BSA und 5%Ziegenserum) für 2x60 Minuten geblockt und permeabilisiert. Über Nacht wurden die Zellen mit Primärantikörpern gegen Vimentin und  $\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin gekoppelt an Cy3 bei 4°C in abgedunkelter Umgebung in der Blockierungslösung inkubiert. Nach fünfmal 10-minütigem Waschen mit der Blockierungslösung, wurden Sekundärantikörper

hinzugefügt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zeitgleich wurde DAPI auf die Zellen gegeben. Nach einer Stunde wurden die Zellen erneut 10 mal 5 Minuten gewaschen und anschließend mit dem Fluoreszenz-Stereomikroskop Leica M205 FCA dargestellt und analysiert.

Tabelle 10: Auflistung verwendeter Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnummer</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung (in Blockierlösung)</b>
Anti-Vimentin	Abcam	Ab92547	Kaninchen	1:500
Anti- $\alpha$ -SMA–Cy3	Sigma Life Science	C6198-2ML	Maus	1:500
Anti DAPI	Thermo Fischer Scientific	D1306		1:10.000
Alexa Fluor 488 anti rabbit	Invitrogen	A11008	Ziege	1:500

### 2.2.3.2. RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte nach Anleitung des RNeasy-Kits der Firma Quiagen. Dazu wurde das Zellpellet, das bei der Zellernte gewonnen wurde, mit 300 $\mu$ l RLT-Puffer resuspendiert, die Reaktion des Lyse Puffers wurde mit 300  $\mu$ l 70% unvergälltem Ethanol unterbrochen. 600 $\mu$ l des Lysats wurden auf eine Spinsäule gegeben und für 15 Sekunden bei 12.000 RPM zentrifugiert. Auf die Spinsäule wurden 700  $\mu$ l RW1-Puffer gegeben und für 15 Sekunden bei 12.000 RPM zentrifugiert. Anschließend wurden zwei Waschdurchgänge mit je 500 $\mu$ l RPE-Puffer durchgeführt, bei denen die Proben erneut bei 12.000 RPM für 15 Sek bzw. zwei Minuten zentrifugiert wurden. Die Spinsäulen wurden in ein neues 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß positioniert und für 1 Minute bei 12.000 RPM zentrifugiert, um etwaige Überschüsse der vorher verwendeten Puffersubstanzen zu eliminieren. Die RNA wurde durch Zugabe von 30  $\mu$ l RNase-freiem Wasser und eine Minute Zentrifugation bei 12.000 RPM von der Spinsäule gelöst und in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt.

### 2.2.3.3. Reverse Transkription

Mit dem iScript cDNA Synthese Kit von BioRad wurde die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden pro Ansatz 4 $\mu$ l 5x iScript Reaciton Mix, 1 $\mu$ l iScript

Reverse Transkriptase und 200 ng totale RNA zusammengegeben, mit nukleasefreiem Wasser wurde der Ansatz auf ein totales Volumen von 20 µl aufgefüllt. Im Thermocycler wurden die Ansätze zur Primeranlagerung für 5 Minuten auf 25°C erhitzt, die reverse Transkription erfolgte für 40 Minuten bei 46°C, bei 96°C wurde die reverse Transkriptase im Anschluss deaktiviert. Die synthetisierte cDNA wurde 1:4 verdünnt.

#### 2.2.3.4. Quantitative Echtzeit PCR

Die quantitative Echtzeit PCR wurde mit Hilfe von iTaq SYBR Green Supermix der Firma Biorad durchgeführt. Für jede Probe enthielt ein PCR-Ansatz folgende Komponenten:

Tabelle 11: Auflistung der Komponenten für einen qPCR-Ansatz

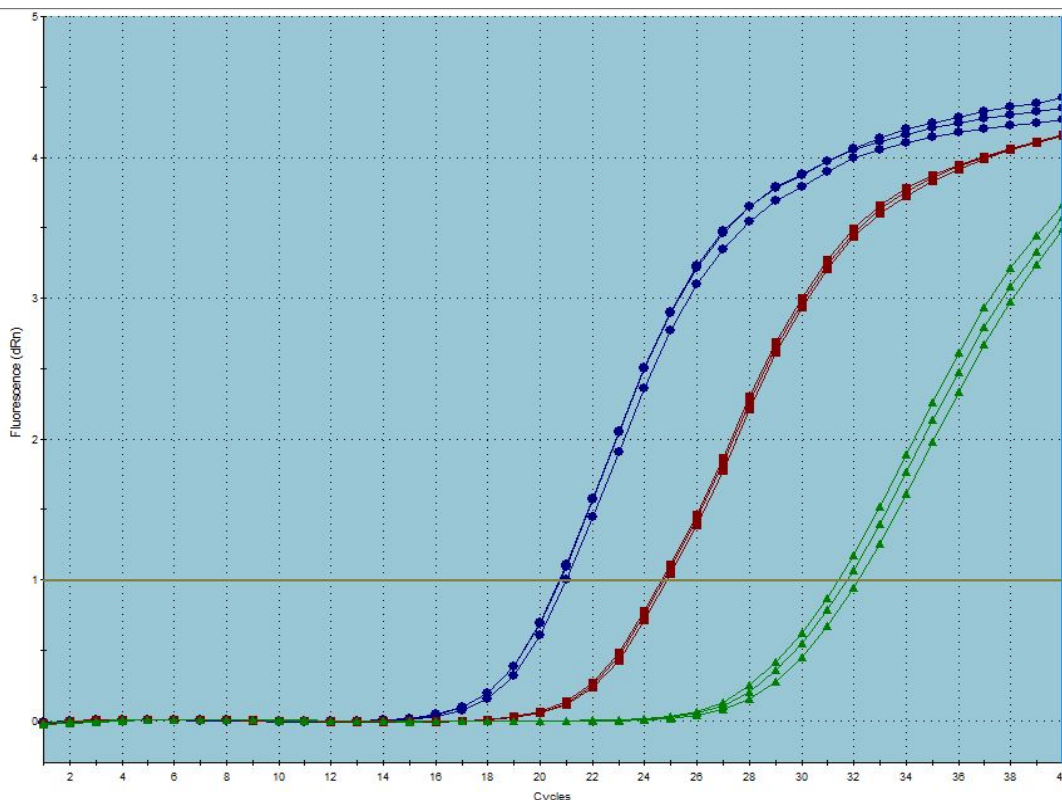
Reagenz	Menge
iTaq SYBR Green Supermix	10 µl
RNase freies Wasser	7 µl
Primermix	0,5 µl
cDNA	2 µl

Die qPCR wurde mit einem qPCR Gerät durchgeführt. Je Probe wurden Triplikate gemessen. Das Thermalprofil wurde in drei Abschnitte aufgeteilt, die jeweils unterschiedlich viele Zyklen umfassten.

Tabelle 12 Thermalprofil qPCR

	Ablauf	Anzahl Zyklen
Denaturierung	10 Minuten 95°C	1
Replikation	10 Sekunden 95°C 20 Sekunden 59°C 10 Sekunden 72°C	40
Inaktivierung	1 Minute 95°C 30 Sekunden 55°C 10 Sekunden 95°C	1

Die Ergebnisse der qPCR wurden als CT-Werte dargestellt. Diese beruhen auf der Fluoreszenz, die proportional zur Konzentration doppelsträngiger DNA anstieg. Die Fluoreszenz wurde durch SYBR Green bedingt, dass sich zwischen die beiden Stränge des DNA-Doppelstrangs einlagert. Der CT-Wert gab dabei die Anzahl der Zyklen an, die benötigt wurden, um eine konstant definierte Fluoreszenzstärke von 1 zu erreichen. Da die Stärke des Fluoreszenzsignals proportional zur Menge der entstandenen Produkte war, konnte dadurch eine Aussage zur Quantität des Ansatzes getroffen werden. Um die Ergebnisse vergleichen zu können, wurde eine relative Quantifizierung durchgeführt. Hierzu wurde ein Referenzgen gemessen, dessen Konzentration sich trotz unterschiedlicher Bedingungen nicht verändert und in allen Zellarten nachweisbar ist. In diesem Versuchsaufbau wurde hierfür Beta-2-Mikroglobulin (B2M) verwendet. Mit Hilfe des CT-Wertes von B2M konnte der normalisierte dCT-Wert ermittelt werden (CT-Wert GOI – CT-Wert B2M). Sollten verschiedene Bedingungen verglichen werden, so geschah dies durch Berechnung des ddCT-Wertes geschehen, bei dem die Differenz zwischen den CT-Werten der Kontrollbedingung und der zu beobachtenden Bedingung berechnet wurde. Aus diesem konnte schließlich die n-fache Veränderung berechnet werden.



**Abbildung 6: Beispielhafte grafische Darstellung der Auswertung einer qPCR**  
 Blauer Graph Referenzgen *B2M*, roter Graph *ACTA2*, grüner Graph *POSTN*  
 definierte Fluoreszenzstärke 1

Tabelle 13: Auflistung verwendeter Primer für qPCR

<b>Gen</b>	<b>Vorwärtsgewandter Primer</b>	<b>Rückwärtsgewandter Primer</b>
<i>B2M</i>	GCCTGCCGTGTGAACCATGTG	TGCGGCATCTTCAAACCTCCATGA
<i>ACTA2</i>	TTCATCGGGATGGAGTCTGC	CTGCTGGAAGGTGGACAGAG
<i>POSTN</i>	ACTGAAGGACCCACACTAACAA	TTGGTGACCTTGGTGACCTCTT
<i>RUNX2</i>	GCCTAGGCGCATTTCAGGTGC	TGAGGTGACTGGCGGGGTGT
<i>COL1A1</i>	TGGTGCCAAGGGTCTGACT	GCTCCAGCCTCTCCATCTTT
<i>LTBP2</i>	GTGAACGGACAGTGTGCCA	ATGGAGATTGCCTTGTCCGA
<i>FAPA</i>	AGAACCATGCTTTGGAGATACT	TTACTCCCAACAGGCGACC
<i>CKAP4</i>	CGAGCAGAAGGTGCAGTCTTT	ATGGATCCCATCCGAGAGGT
<i>PDGFRA</i>	TGAAATTCGCTGGAGGGTCA	TGGCCGTGGGTTTTAGCAT
<i>CILP1</i>	GGACGCCATTGCTTCTACT	GAGTCTGGACCCCAGTCTGA
<i>COMP1</i>	TCCCAGAAGAACGACGACCA	TCTCCATCCTGGTCTTGATCGC
<i>OPN</i>	AGGCATCACCTGTGCCATAC	GAAGGGTCTGTGGGGCTAGG
<i>SPARC</i>	CCTGTACACTGGCAGTTCCGG	CCTTGTCGATATCCTTCTGCTT
<i>SNAI1</i>	CTCTCTGAGGCCAAGGATCTC	GACATCTGAGTGGGTCTGGA
<i>LOX</i>	TGCTGACGTTTAGGTCTCCC	GTAATGTTGATGACAACCTGTGCCA
<i>VINCULIN</i>	GTGGACCAGCTAACCAACG	CCTGGATTTCTCTTCGTGGA
<i>DECORIN</i>	TCCTTTCCACACCTGCAAACCT	TCCAGACCCAAATCAGAACACT
<i>DDR2</i>	CCCCTGGATGAAACCTCCATCA	GGCTACAGTCTCCCTCTGGG
<i>SI00A4</i>	TCTTGTTTGTATCCTGACTGCT	TCACCCTCTTTGCCCGAGTA
<i>TCF21</i>	GTCAACCTGACGTGGCCCTTTA	CAGACTCGCACCTCCAAGG
<i>EMC</i>	TCCAAACCCAAGAGTAGTGTCT	ATTTTCTGGTGTGCCCGGAT
<i>PDGFRB</i>	CCCAGTTATCAGAAAGACTGC	GCCAGCCTCTACCTGTGTCAC
<i>NG2</i>	CACAGAGGAACCCTGGATGGA	GGGGGCATCTCATGCTCATA
<i>CD146</i>	TCCGCGTCTACAAAGCTCC	TGGGACGACTGAATGTGGAC

### **2.2.3.5. Protein-Isolation**

Das Zellpellet, das bei der oben beschriebenen Zellernte gewonnen wurde, wurde in 300µl RIPA Lysis and Extraction Buffer, welcher mit 3 µl 0.5M EDTA Solution und 3µl Halt Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X) versetzt wurde, resuspendiert. Die Mikroreaktionsgefäße wurden anschließend für 30 Minuten bei 4°C im Überkopfrotationsmischer inkubiert und anschließend bei 4°C für 15 Minuten bei 12 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### **2.2.3.6. Bestimmung der Proteinkonzentration**

Um die Proteinkonzentration der gewonnenen Probe zu bestimmen, wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit von Thermo scientific verwendet.

Hierfür wurde die entsprechende Probe 1:3 mit DPBS verdünnt. Neben den zu messenden Proben wurden neun Standards in je zwei Replikaten à 25 µl in eine 96-Well-Platte gegeben, in jedes Well kamen zudem 200µl Arbeitsansatz, der zu 50 Teilen aus Reagenz A und 1 Teil Reagenz B zusammengesetzt war. Die Platte wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend wurde die Absorption der einzelnen Ansätze an einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 562nm gemessen. Durch die gemessene Absorption der Standards mit bekannter Proteinkonzentration konnte eine Standardkurve erstellt und die Konzentration der Proben ermittelt werden.

### **2.2.3.7. SDS-PAGE**

Die Proben wurden mit DPBS und einem Ladepuffer „Roti-Load 1“ der Firma Roth auf eine einheitliche Konzentration zwischen 0,2 und 0,5 µg/µl verdünnt. Der Anteil des Ladepuffers betrug dabei 25% des gesamten Ansatzes. Die Proben wurden anschließend für 5 Minuten bei 99°C denaturiert.

Für den SDS-Page wurde ein Laufgel (pH 8,8) gegossen, dessen Porendichte bei 10% lag. In das Sammelgel mit einer Porengröße von 5% und einem pH-Wert von 6,8 wurde ein Kamm mit 15 Taschen positioniert. Für die Gele wurden folgende Reagenzien verwendet:

Tabelle 14: Zusammensetzung von Lauf- und Sammelgel für SDS-Page

	Laufgel (ml)	Sammelgel (ml)
Vollentsalztes H <sub>2</sub> O	4,0	1,4
10 % „Rotiphorese Gel 30“ (Acrylamidstammlösung)	3,3	0,33
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5	0
1,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	0	0,25
10% SDS	0,1	0,02
TEMED	0,004	0,002
10% Ammoniumpersulfat	0,1	0,02

Die Gele wurden in Kammern mit einfach konzentriertem SDS eingesetzt. 25 µl der verdünnten Proben wurden in die jeweilige Geltasche gegeben, in eine der Taschen wurden 10 µg eines Proteinmarkers gegeben.

Zur Auftrennung der Proteine wurde eine Spannung von zuerst 50 V für 15 Minuten angelegt, anschließend wurde die Spannung für ca. 100 Minuten auf 100V erhöht, bis die Lauffront aus dem Gel herausgelaufen war.

Im Anschluss wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran gebロットet. Der Komplex aus Membran und Gel wurde zwischen jeweils zwei Filtermatten und Filterpapieren beidseits eingerahmt und in eine Blottingkammer mit Transferpuffer eingesetzt. In die Kammer wurde zudem ein Kühlelement gegeben, um die Apparatur vor Überhitzung zu schützen. Während der gesamten Zeit wurde die Pufferflüssigkeit gerührt. Für den Transfer wurde für 90 Minuten eine Spannung von 100V angelegt.

Nach dem Blotten wurde die Membran für 30 Minuten in 5% Milch geblockt. Über Nacht wurde die Membran im Primärantikörper bei 4°C inkubiert, am nächsten Tag 5 mal 5 Minuten mit TBS-T gewaschen und anschließend für 90 Minuten bei Raumtemperatur im Sekundärantikörper inkubiert. Danach erfolgten erneut fünf Waschschriffe à 5 Minuten. Der Blot wurde mit Entwicklerreagenz entwickelt.

Um die gebundenen Primär- bzw. Sekundärantikörper zu entfernen, wurde die Membran nach dem Entwickeln für 30 Minuten in 10ml *Stripping-Buffer* oder alternativ bei einem Wechsel der Antikörperspezies für 30 Minuten in 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert und anschließend

mit TBS-T gewaschen. Über Nacht konnte die Membran in einem neuen Primärantikörper inkubiert werden.

Tabelle 15: Auflistung verwendeter Antikörper für SDS-Page

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Artikel- nummer</b>	<b>Größe</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung (in 5%Milch)</b>
$\alpha$ -SMA	Abcam	ab119952	42 kDa	Maus	1:1000
COL1	Rockland	600-401- 103-0.1	130 kDa 139 kDa	Kaninchen	1:2500
PCNA	Abcam	ab18197	29 kDa	Kaninchen	1:1000
RUNX2	Santacruz		55 kDa	Maus	1:1000
TAK-1	Santacruz			Maus	1:1000
p-SAPK (JNK)	Cell signaling	9251	46 kDa 57 kDa	Kaninchen	1:1000
SAPK (JNK)	Cell signaling	9252	46 kDa 57 kDa	Kaninchen	1:1000
p-ERK 1/2	Cell signaling	4370	42 kDa 44 kDa	Kaninchen	1:2000
Phospho-p38 MAPK	Cell signaling	9211	43 kDa	Kaninchen	1:1000
Phospho-NF- $\kappa$ B p65	Cell signaling	3033	65 kDa	Kaninchen	1:1000
VINCULIN	Sigma aldrich	V9131	116 kDa	Maus	1:2500
Anti-rabbit IgG, HRP linked	Cell signaling	7074		Ziege	1:2500
Anti-mouse IgG, HRP linked	Cell signaling	7076		Pferd	1:2500

#### **2.2.3.8. Statistik**

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mittels der Software GraphPad Prism 5.0. Zum Vergleich von mehreren Gruppen wurde ein einfaktorieller ANOVA und ein Students-Newman-Keuls post hoc angewendet. Für die Analyse zweier Gruppen wurde ein ungepaarter t-test herangezogen. Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben. Als signifikant wurden p-Werte von  $<0,05$  definiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Charakterisierung der kardialen Fibroblasten

##### 3.1.1. Charakterisierung der verwendeten Zellen anhand von Zellmarkern

Die verwendeten Zellen wurden aus dem adulten Herzventrikel isoliert und von der Firma Promocell mittels verschiedener Marker identifiziert. Dabei wurden CD90 positive,  $\alpha$ SMA und slow myosin negative Zellen ausgewählt.

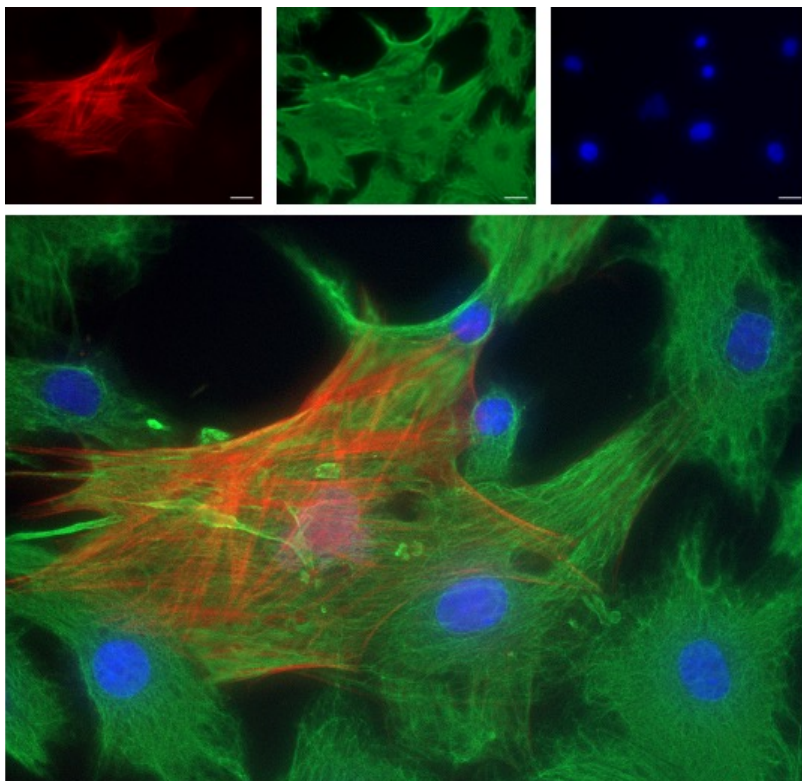
Um die Identität der kardialen Fibroblasten zu bestätigen, wurden für diese Arbeit verschiedene qPCR durchgeführt. Dabei wurden sowohl Fibroblastenmarker als auch Marker für glatte Muskelzellen, Endothelzellen und Perizyten verwendet. Als nachweisbar galten die Genprodukte, wenn nach 40 Zyklen der qPCR ein Fluoreszenzsignal messbar war.

Tabelle 16: Auflistung untersuchter Zellmarker zur Charakterisierung der verwendeten Zellen

<i>ACTA2</i>	Nachweisbar
<i>VIMENTIN</i>	Nachweisbar
<i>DECORIN</i>	Nachweisbar
<i>DDR2</i>	Nachweisbar
<i>S100A4</i>	Nachweisbar
<i>TCF21</i>	Nachweisbar
<i>EMC</i>	Nachweisbar
<i>PDGFRA</i>	Nachweisbar
<i>PDGFRB</i>	Nachweisbar
<i>NG2</i>	Nachweisbar

### 3.1.2. Charakterisierung der kardialen Fibroblasten mittels Immunfluoreszenzfärbung

Um die Morphologie der Zellen genauer beurteilen zu können, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Dabei erfolgte die Färbung mit jeweils einem spezifischen Antikörper gegen  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin und einem gegen das Strukturprotein Vimentin. Zusätzlich erfolgte die Anfärbung des Zellkerns mittels DAPI. Bei Betrachtung der Immunfluoreszenzaufnahmen, wurde deutlich, dass alle betrachteten Zellen positiv für das Strukturprotein Vimentin waren. Durch die Anfärbung des am Zytoskelett beteiligten Proteins, wurden der flächige Zelleib und irreguläre zytoplasmatische Ausläufer der Zellen sichtbar. Der Zellkern lag zentral im Zelleib. Einige der Zellen zeigten intrazelluläre fadenförmige Strukturen, die positiv für  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin waren. Diese Strukturen zeigten keine gleichmäßige Anordnung, sondern einen unterschiedlichen Verlauf. Sie waren sowohl zentral als auch in der Peripherie des Zellkörpers nachweisbar.



**Abbildung 7: Mikroskopische Aufnahme der verwendeten Zellen vor Stimulation mittels Immunfluoreszenzfärbung**

Darstellung verschiedener Proteine: rot = Färbung von  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin, grün = Färbung des Strukturproteins Vimentin, blau = DAPI-Färbung der Zellkerne

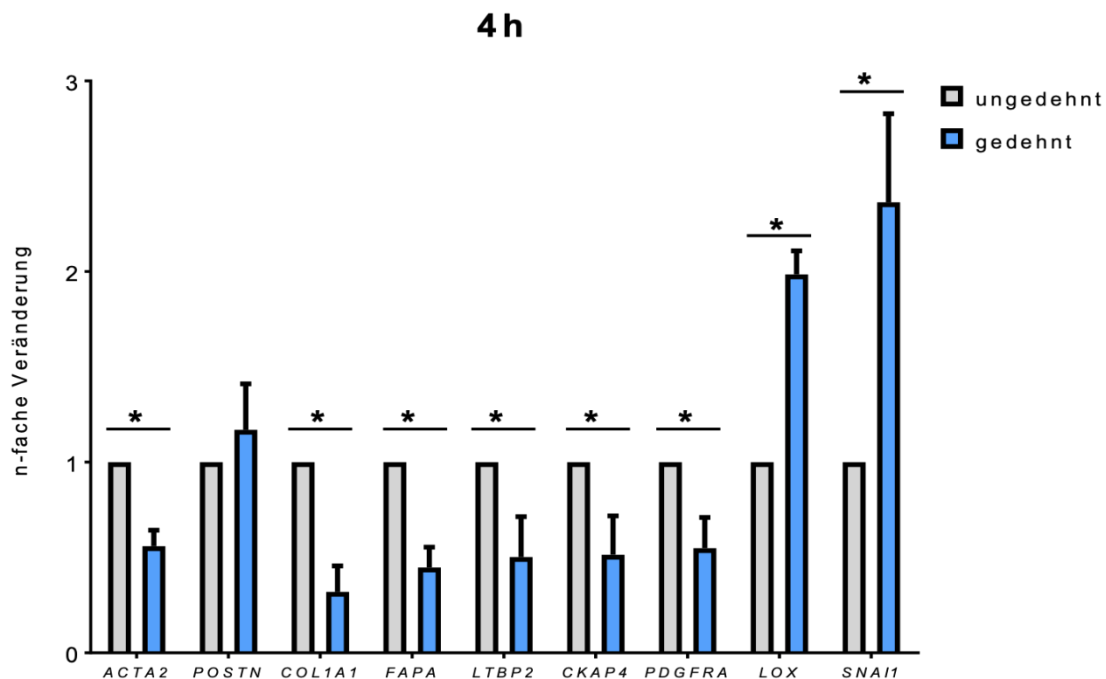
### **3.2. Mechanische Stimulation durch Dehnung**

Um die Auswirkungen mechanischer Dehnung von kardialen Fibroblasten zu analysieren, wurden kardiale Fibroblasten mit und ohne mechanische Dehnung auf einer Kollagen-Typ 1- oder Laminin-Matrix kultiviert. Die biochemische Analyse erfolgte 4, 24 und 48 Stunden nach Stimulationsbeginn.

Um mögliche Veränderungen auf Transkriptionsebene durch den mechanischen Stimulus in Form von Dehnung und die jeweilige Beschichtung mit Kollagen bzw. Laminin zu ermitteln, wurde im Anschluss die mRNA der Zellen isoliert und die Expression ausgewählter Gene mittels qPCR analysiert. Dabei wurden bereits etablierte Aktivierungsmarker für Fibroblasten untersucht, sowie die Veränderungen der Expression von osteogenen Markern. Die Ergebnisse wurden als die n-fache Veränderung der Expression durch Dehnung im Vergleich zur Expression in ungedehnten Zellen dargestellt.

Eventuelle Veränderungen auf Translationsebene sollten durch die Herstellung und Entwicklung von SDS-PAGE analysiert werden. Dabei wurden Aktivierungsmarker und an Signalkaskaden beteiligte Proteine zu den verschiedenen Isolierungszeitpunkten detektiert und miteinander verglichen.

### 3.2.1. Veränderungen der Expression von Aktivierungsmarkern in kardialen Fibroblasten auf Transkriptionsebene durch mechanische Dehnung auf einer kollagenbeschichteten Matrix



**Abbildung 8: Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern nach 4 Stunden bi-axialer Dehnung auf einer kollagenbeschichteten Membran**

Analysiert wurde die Expression der Gene *ACTA2*, *POSTN*, *COL1A1*, *FAPA*, *LTBP2*, *CKAP4*, *PDGFRA*, *LOX* und *SNAI1*

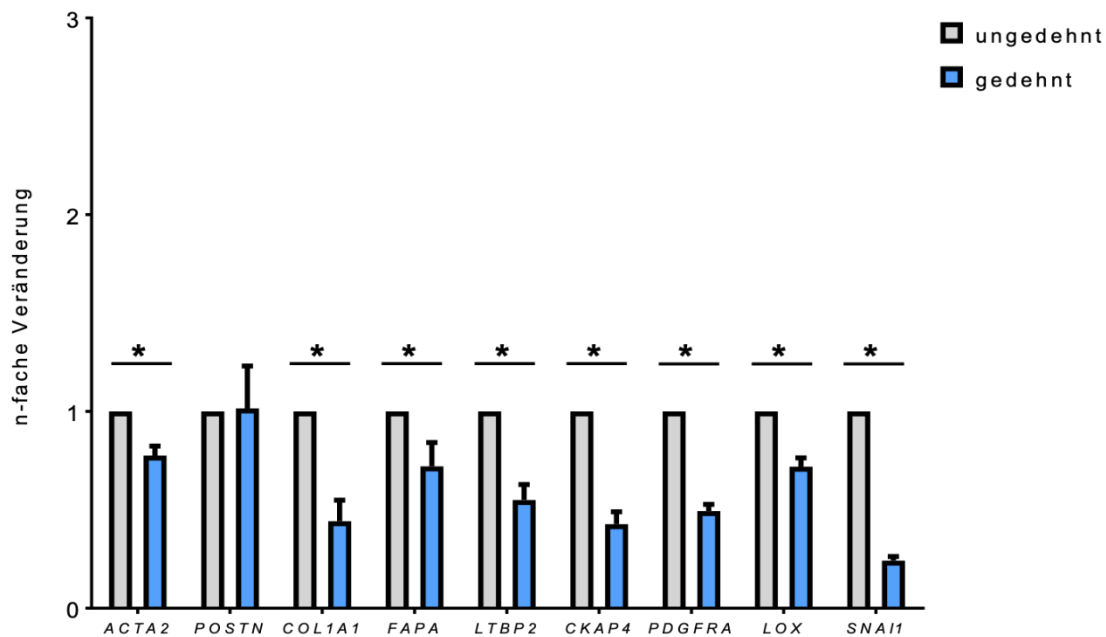
Darstellung der n-fachen Veränderung der Expression durch Dehnung im Vergleich zu der Expression in nicht gedehnten Zellen auf einer kollagenbeschichteten Membran

Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM, \*:  $p < 0,05$ , Statistik mittels ungepaartem t-Test,  $n=6$  (entspricht technischen Replikaten)

Betrachtete man die Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern in Zellen, die mittels Unter- und Überdruckgeneration auf kollagenbeschichtetem Untergrund gedehnt wurden, sah man zu den verschiedenen Isolierungszeitpunkten unterschiedliche Veränderungen.

Zellen, die nach 4 Stunden Stimulation geerntet wurden, wiesen für einen Großteil der Gene eine signifikant geringere Expression auf als Kontrollzellen. Ausnahmen bildeten die Marker *LOX* und *SNAI1*, deren Expression mit einer Steigerung auf das 1,9 - ( $\pm 0,12$ ) bzw. 2,4 - ( $\pm 0,46$ ) fache signifikant erhöht war. Die Expression von *POSTN* wies derweil keine signifikante Veränderung durch den mechanischen Stimulus auf.

24 h



**Abbildung 9: Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern nach 24 Stunden bi-axialer Dehnung auf einer kollagenbeschichteten Membran**

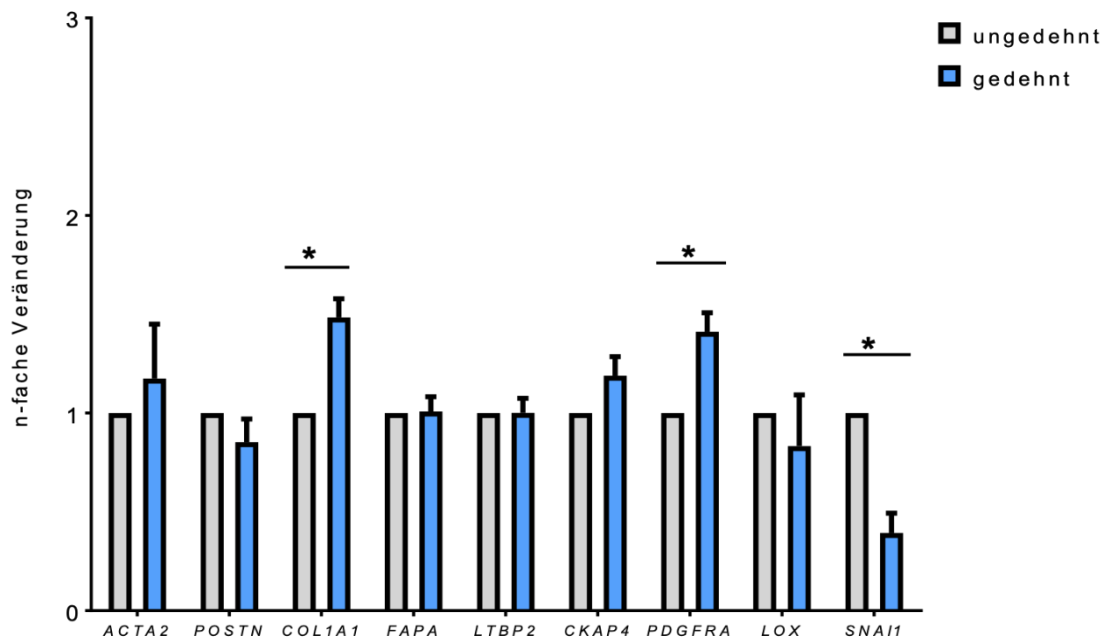
Analysiert wurde die Expression der Gene *ACTA2*, *POSTN*, *COL1A1*, *FAPA*, *LTBP2*, *CKAP4*, *PDGFRA*, *LOX* und *SNAI1*

Darstellung der n-fachen Veränderung der Expression durch Dehnung im Vergleich zu der Expression in nicht gedehnten Zellen auf einer kollagenbeschichteten Membran

Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM, \*:  $p < 0,05$ , Statistik mittels ungepaartem t-Test,  $n=6$  (entspricht technischen Replikaten)

Nach 24 Stunden Stimulation waren die Veränderungen der Expression für die meisten Marker ähnlich wie in den Zellen, die nach 4 Stunden geerntet wurden. Der Marker *ACTA2* war dabei mit der  $0,78 (\pm 0,05)$ -fachen Expression der Marker mit der geringsten Veränderung der Expression im Vergleich zu den nicht gedehnten Zellen. Der Marker *POSTN* zeigte auch zu diesem Isolierungszeitpunkt keine signifikante Veränderung. Unterschiede zum 4-Stunden-Zeitpunkt zeigten sich bei den Markern *LOX* und *SNAI1*, die nun auch erniedrigt waren. Dabei war die Expression von *SNAI1* mit dem  $0,24 (\pm 0,02)$ -fachen am stärksten erniedrigt.

48 h



**Abbildung 10: Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern nach 48 Stunden bi-axialer Dehnung auf einer kollagenbeschichteten Membran**

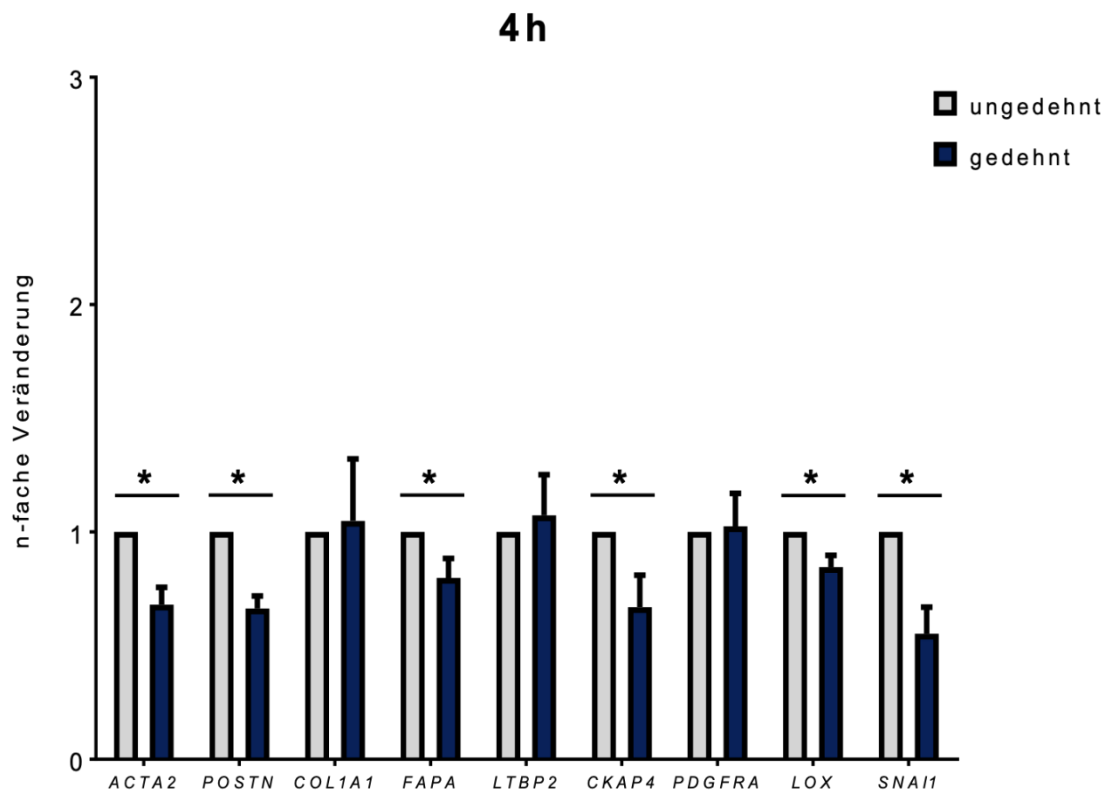
Analysiert wurde die Expression der Gene *ACTA2*, *POSTN*, *COL1A1*, *FAPA*, *LTBP2*, *CKAP4*, *PDGFRA*, *LOX* und *SNAI1*

Darstellung der n-fachen Veränderung der Expression durch Dehnung im Vergleich zu der Expression in nicht gedehnten Zellen auf einer kollagenbeschichteten Membran

Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM, \*:  $p < 0,05$ , Statistik mittels ungepaartem t-Test,  $n=6$  (entspricht technischen Replikaten)

Nach 48 Stunden bi-axialer Dehnung stieg die Expression von *COL1A1* und *PDGFRA* auf das 1,5-fache ( $\pm 0,10$ ) bzw. das 1,4 - ( $\pm 0,10$ ) fache der Expression in den statischen Kontrollzellen signifikant an. *SNAI1* war wie schon nach 24 Stunden auf das 0,4- ( $\pm 0,09$ ) fache signifikant erniedrigt. Die Ergebnisse der anderen Aktivierungsmarker wiesen eine starke Streuung auf, sodass die Werte nicht signifikant waren und sich zudem keine Aussage über eine Tendenz treffen ließ.

### 3.2.2. Veränderungen der Expression von Aktivierungsmarkern in kardialen Fibroblasten auf Transkriptionsebene durch mechanische Dehnung auf einer lamininbeschichteten Matrix



**Abbildung 11: Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern nach 4 Stunden bi-axialer Dehnung auf einer lamininbeschichteten Membran**

Analysiert wurde die Expression von *ACTA2*, *POSTN*, *COL1A1*, *FAPA*, *LTBP2*, *CKAP4*, *PDGFRA*, *LOX* und, *SNAI1*

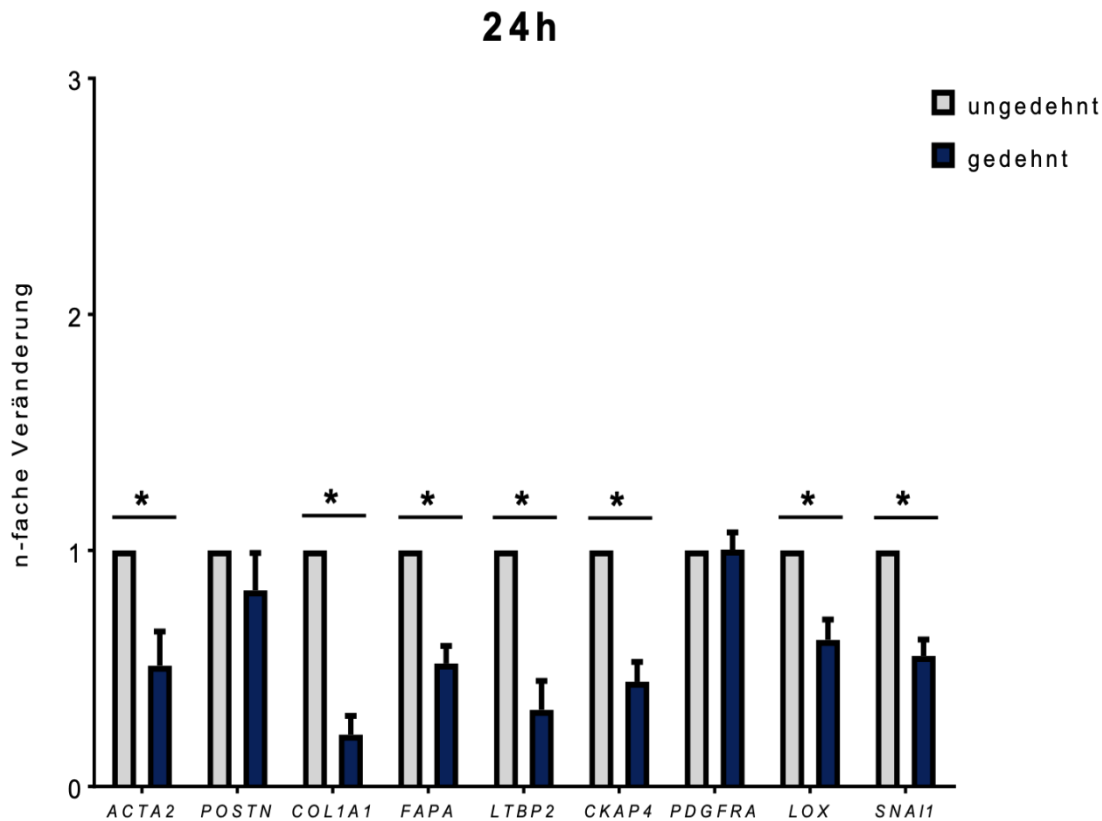
Darstellung der n-fachen Veränderung der Expression durch Dehnung im Vergleich zu der Expression in nicht gedehnten Zellen auf einer kollagenbeschichteten Membran

Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM, \*:  $p < 0,05$ , Statistik mittels ungepaartem t-Test,  $n=6$  (entspricht technischen Replikaten)

Untersucht wurden neben den Auswirkungen von bi-axialer Dehnung auf einer kollagenbeschichteten Matrix auch die Dehnung auf einer lamininbeschichteten Matrix. Hier kam es nach 4 Stunden Dehnung zu einer signifikanten Erniedrigung der Aktivierungsmarker *ACTA2*, *POSTN*, *FAPA*, *CKAP4* in den mechanisch gedehnten Zellen, verglich man deren Expression mit der Expression in den entsprechenden Kontrollzellen.

Im Gegensatz zu kardialen Fibroblasten, die auf einer kollagenbeschichteten Membran gedehnt wurden, waren zudem die Expression der Marker *LOX* und *SNAI1* schon nach 4 Stunden signifikant auf das  $0,85 (\pm 0,051)$  - bzw. das  $0,55 (\pm 0,12)$  - fache erniedrigt.

Für die Expression von *COL1A1*, *LTBP2* und *PDGFRA* ließ sich zu diesem Zeitpunkt keine signifikante Veränderung durch mechanische Dehnung feststellen.



**Abbildung 12: Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern nach 24 Stunden bi-axialer Dehnung auf einer lamininbeschichteten Membran**

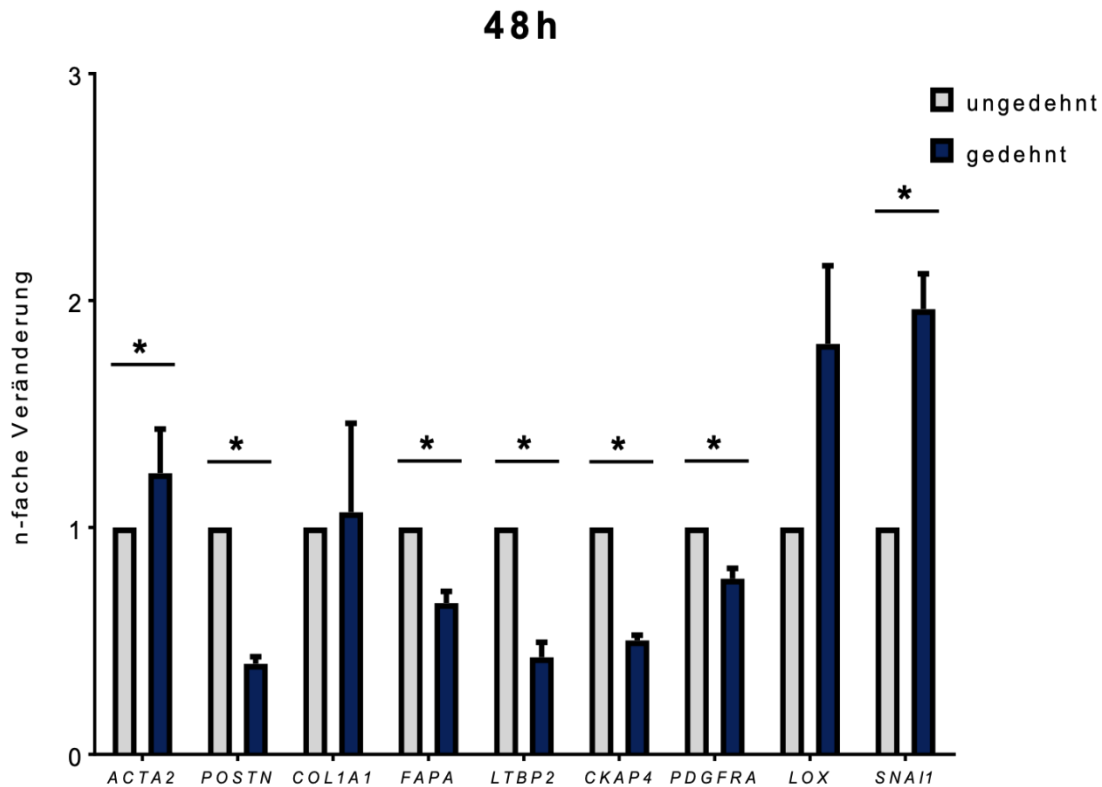
Analysiert wurde die Expression von *ACTA2*, *POSTN*, *COL1A1*, *FAPA*, *LTBP2*, *CKAP4*, *PDGFRA*, *LOX* und, *SNAI1*

Darstellung der n-fachen Veränderung der Expression durch Dehnung im Vergleich zu der Expression in nicht gedehnten Zellen auf einer kollagenbeschichteten Membran

Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM, \*:  $p < 0,05$ , Statistik mittels ungepaartem t-Test,  $n=6$  (entspricht technischen Replikaten)

24 Stunden nach Stimulationsbeginn ließ sich eine signifikante Erniedrigung der Expression eines Großteils der Aktivierungsmarker durch mechanische Dehnung feststellen. Dies entsprach etwa der Entwicklung, die nach 4 Stunden beobachtet werden konnte. Am stärksten sank die Expression von *COL1A1*, die auf das 0,22 ( $\pm$  0,08) – fache der Expression in den nicht gedehnten Kontrollzellen sank. Die Expression der übrigen Aktivierungsmarker lag beim 0,32 – bis 0,62 – fachen der Expression, die in den Kontrollzellen gemessen wurde.

Wie schon nach 4 Stunden war zwischen den Expressionen von *PDGFRA* in den gedehnten Zellen und in den nicht gedehnten Zellen kein signifikanter Unterschied erkennbar. Dies galt nach 24 Stunden auch für den Marker *POSTN*.



**Abbildung 13: Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern nach 48 Stunden bi-axialer Dehnung auf einer lamininbeschichteten Membran**

Analysiert wurde die Expression von *ACTA2*, *POSTN*, *COL1A1*, *FAPA*, *LTBP2*, *CKAP4*, *PDGFRA*, *LOX* und, *SNAI1*

Darstellung der n-fachen Veränderung der Expression durch Dehnung im Vergleich zu der Expression in nicht gedehnten Zellen auf einer kollagenbeschichteten Membran

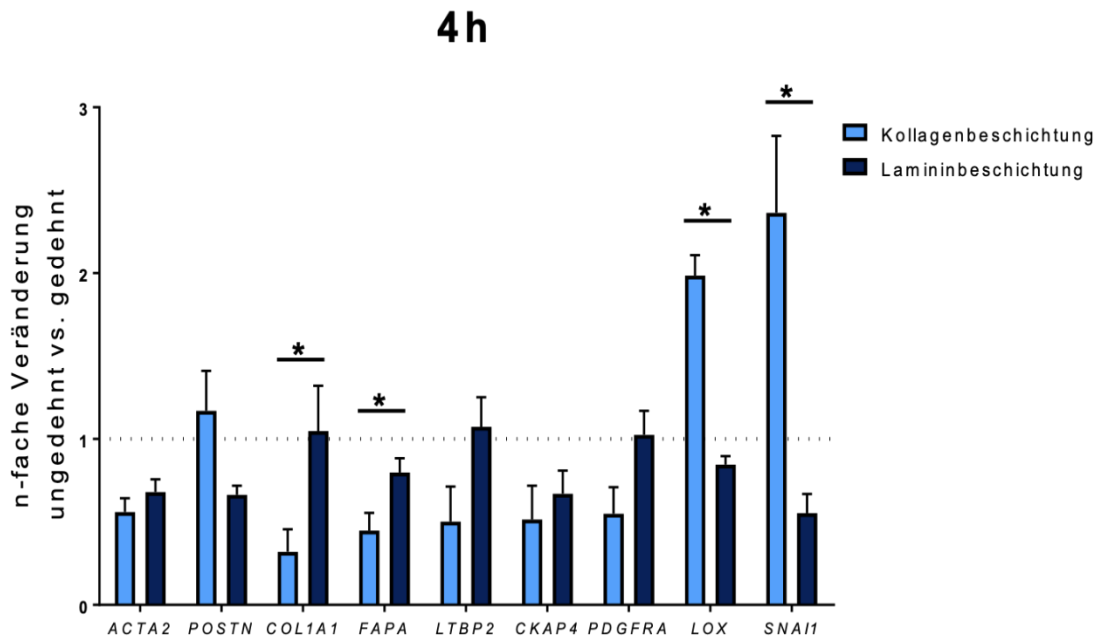
Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM, \*:  $p < 0,05$ , Statistik mittels ungepaartem t-Test,  $n=6$  (entspricht technischen Replikaten)

Wurden die kardialen Fibroblasten 48 Stunden lang mechanisch gedehnt, so stellten sich die Aktivierungsmarker *POSTN*, *FAPA*, *LTBP2*, *CKAP4* und *PDGFRA* als signifikant erniedrigt dar. Die Expression befand sich zwischen dem 0,39- und dem 0,77- fachen der Expression in nicht gedehnten Zellen.

Die Expression der Marker *ACTA2*, *LOX* und *SNAI1* war anders als zu den vorherigen Isolierungszeitpunkten nach 48 Stunden signifikant erhöht. Bei *ACTA2* lag die Erhöhung

beim  $1,2 (\pm 0,19)$  – fachen, die Expression von *LOX* und *SNAIL* stieg auf das  $2,08 (\pm 0,27)$  – bzw. das  $1,96 (\pm 0,15)$  – fache verglichen mit den Kontrollzellen.

### 3.2.3. Vergleich der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern auf Transkriptionsebene in Abhängigkeit der Beschichtung der Membran mit Kollagen oder Laminin



**Abbildung 14: Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern nach 4 Stunden bi-axialer Dehnung, Vergleich zwischen kollagen- und lamininbeschichteten Membranen**

Analysiert wurden die Unterschiede in der Veränderung der Expression von *ACTA2*, *POSTN*, *COL1A1*, *FAPA*, *LTBP2*, *CKAP4*, *PDGFRA*, *LOX*, *SNAI1*

Darstellung der n-fachen Veränderung der Expression durch Dehnung im Vergleich zu der Expression in nicht gedehnten Zellen auf einer kollagen- bzw. lamininbeschichteten Membran

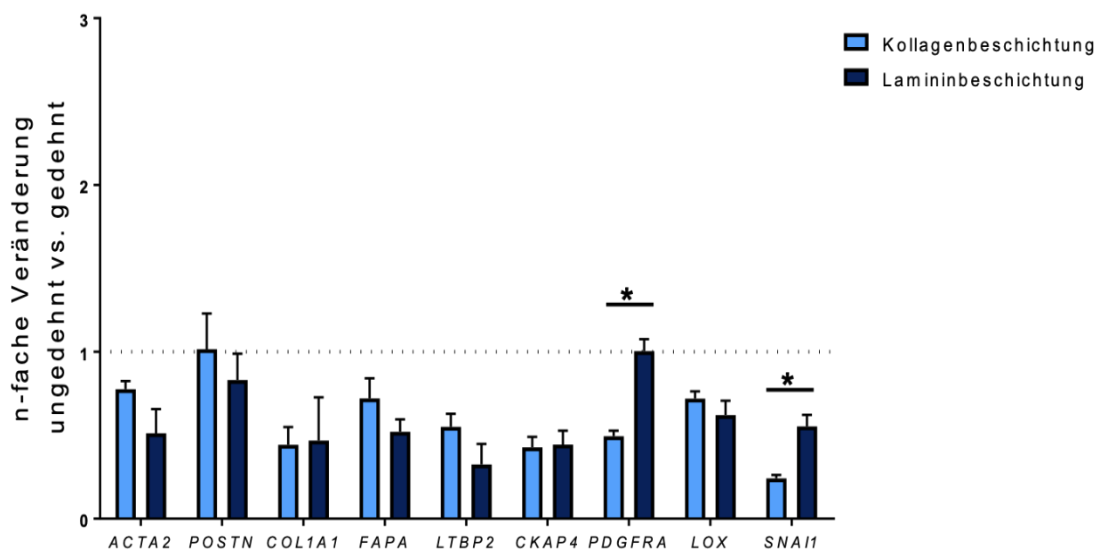
Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM, \*:  $p < 0,05$ , Statistik mittels ungepaartem t-Test,  $n=6$  (entspricht technischen Replikaten)

Verglich man die Veränderungen der Expression in Zellen durch bi-axiale Dehnung in Abhängigkeit von der Beschichtung des Untergrundes mit Kollagen oder Laminin, stellte sich eine signifikant niedrigere Veränderung der Expression von *COL1A1* und *FAPA* in den auf einer kollagenbeschichteten Membran gedehnten Zellen dar. Dabei sank die Expression von *COL1A1* in den Zellen, die auf einer kollagenbeschichteten Membran gedehnt wurden, unter das Niveau der Expression in nicht gedehnten Zellen, während sie in den auf einer lamininbeschichteten Membran gedehnten Zellen ähnlich dem Niveau in ungedehnten Kontrollzellen blieb.

Die Expression von *FAPA* sank unabhängig von der Beschichtung in den stimulierten Zellen verglichen mit der Expression in den jeweils nicht stimulierten Kontrollzellen. Der Rückgang der Expression durch Dehnung auf einer lamininbeschichteten Membran war

mit einer Verminderung auf das  $0,45 (\pm 0,11)$  – fache signifikant stärker als der Rückgang der Expression in Zellen auf kollagenbeschichtetem Untergrund. Die Marker *LOX* und *SNAI1* wurden nach 4 Stunden Dehnung auf einer mit Kollagen beschichteten Membran deutlich stärker exprimiert, während es durch Dehnung auf einer mit Laminin beschichteten Membran zu einer Reduktion der Expression kam. Diese Verhältnisse konnten als signifikant unterschiedlich bewertet werden. Bei den übrigen Aktivierungsmarkern konnte kein signifikanter Einfluss der Beschichtung der Silikonelastomermatrix auf die Veränderung der Expression beobachtet werden

## 24h



**Abbildung 15: Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern nach 24 Stunden bi-axialer Dehnung, Vergleich zwischen kollagen- und lamininbeschichteten Membranen**

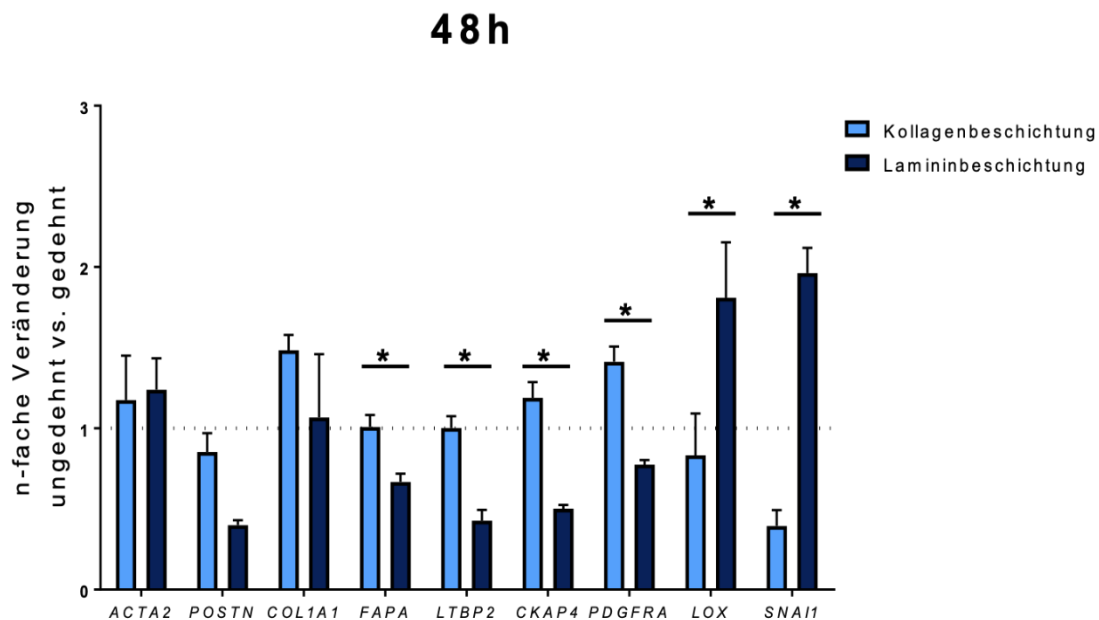
Analysiert wurden die Unterschiede in der Veränderung der Expression von *ACTA2*, *POSTN*, *COL1A1*, *FAPA*, *LTBP2*, *CKAP4*, *PDGFRA*, *LOX*, *SNAI1*

Darstellung der n-fachen Veränderung der Expression durch Dehnung im Vergleich zu der Expression in nicht gedehnten Zellen auf einer kollagen- bzw. lamininbeschichteten Membran

Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM, \*:  $p < 0,05$ , Statistik mittels ungepaartem t-Test,  $n=6$  (entspricht technischen Replikaten)

Nach 24 Stunden Stimulation waren die Expressionsveränderungen in Bezug auf die Beschichtung mit Kollagen bzw. Laminin für die meisten Aktivierungsmarker ähnlich. Eine Ausnahme bildete die Veränderung der Expression von *PDGFRA*. Hier ließ sich ein signifikanter Unterschied in der Veränderung der Expression nach 24 Stunden

Stimulation zwischen den Beschichtungen feststellen. Die Expression von *PDGFRA* lag nach 24 Stunden Dehnung auf einer kollagenbeschichteten Membran bei dem 0,49 ( $\pm 0,03$ ) – fachen der Expression in ungedehnten Zellen. Derweil konnte keine signifikante Veränderung der Expression von *PDGFRA* durch 24 Stunden Dehnung in den Zellen festgestellt werden, die auf einem lamininbeschichteten Untergrund gedehnt wurden. Die Expression von *SNAI1* sank nach 24 Stunden unabhängig von der Beschichtung im Vergleich zu ungedehnten Zellen ab. Der Rückgang der Expression war in den Zellen auf der kollagenbeschichteten Membran signifikant stärker als der Rückgang in den Zellen auf einer lamininbeschichteten Membran.



**Abbildung 16: Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern nach 48 Stunden bi-axialer Dehnung, Vergleich zwischen kollagen- und lamininbeschichteten Membranen**

Analysiert wurden die Unterschiede in der Veränderung der Expression von *ACTA2*, *POSTN*, *COL1A1*, *FAPA*, *LTBP2*, *CKAP4*, *PDGFRA*, *LOX*, *SNAI1*

Darstellung der n-fachen Veränderung der Expression durch Dehnung im Vergleich zu der Expression in nicht gedehnten Zellen auf einer kollagen- bzw. lamininbeschichteten Membran

Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM, \*:  $p < 0,05$ , Statistik mittels ungepaartem t-Test,  $n=6$  (entspricht technischen Replikaten)

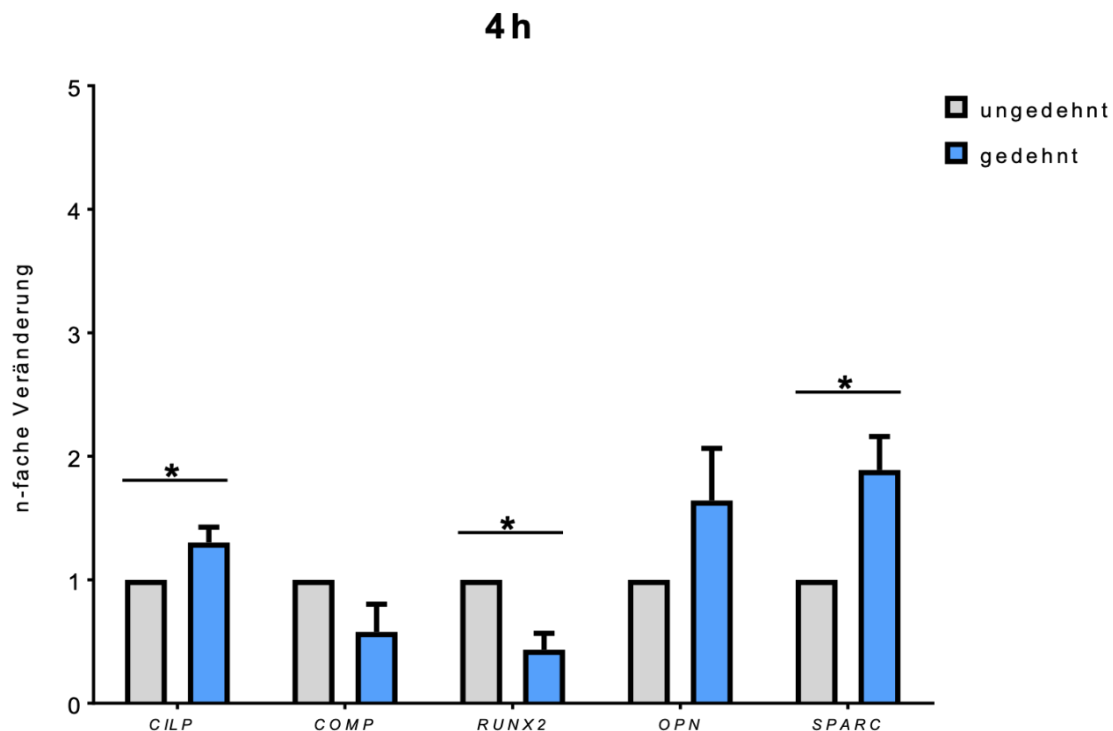
Nach 48 Stunden mechanischer Dehnung stellten sich bei der Mehrzahl der Aktivierungsmarker signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Beschichtungen und deren Einfluss auf die Expression der Aktivierungsmarker dar. Während die Expression von *FAPA*, *LTBP2*, *CKAP4* und *PDGFRA* durch 48 Stunden

Dehnung auf einer mit Laminin beschichteten Membran deutlich auf das 0,43- bis 0,78-fache der Expression in den Kontrollzellen verringert war, blieb die Expression der Marker in den Zellen, die auf einer kollagenbeschichteten Membran gedehnt wurden, ähnlich der Expression in nicht gedehnten Zellen.

Die Marker *SNAIL* und *LOX* wurden nach 48 Stunden Dehnung auf einer lamininbeschichteten Membran deutlich höher exprimiert als unter Kontrollbedingungen. Damit wich der Einfluss der Lamininbeschichtung signifikant von dem der Kollagenbeschichtung ab. Durch Dehnung auf einer mit Kollagen beschichteten Membran sank die Expression von *SNAIL* auf das  $0,39 (\pm 0,10)$  – fache ab, während die Expression von *LOX* nicht signifikant durch Dehnung beeinflusst wurde.

Kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Beschichtungen ließ sich für die Veränderung der Expression von *ACTA2*, *POSTN* und *COL1A1* feststellen.

### 3.2.4. Veränderungen der Expression von osteogenen Markern in kardialen Fibroblasten auf Transkriptionsebene durch mechanische Dehnung auf einer kollagenbeschichteten Matrix



**Abbildung 17: Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von osteogenen Markern nach 4 Stunden bi-axialer Dehnung auf einer kollagenbeschichteten Membran**

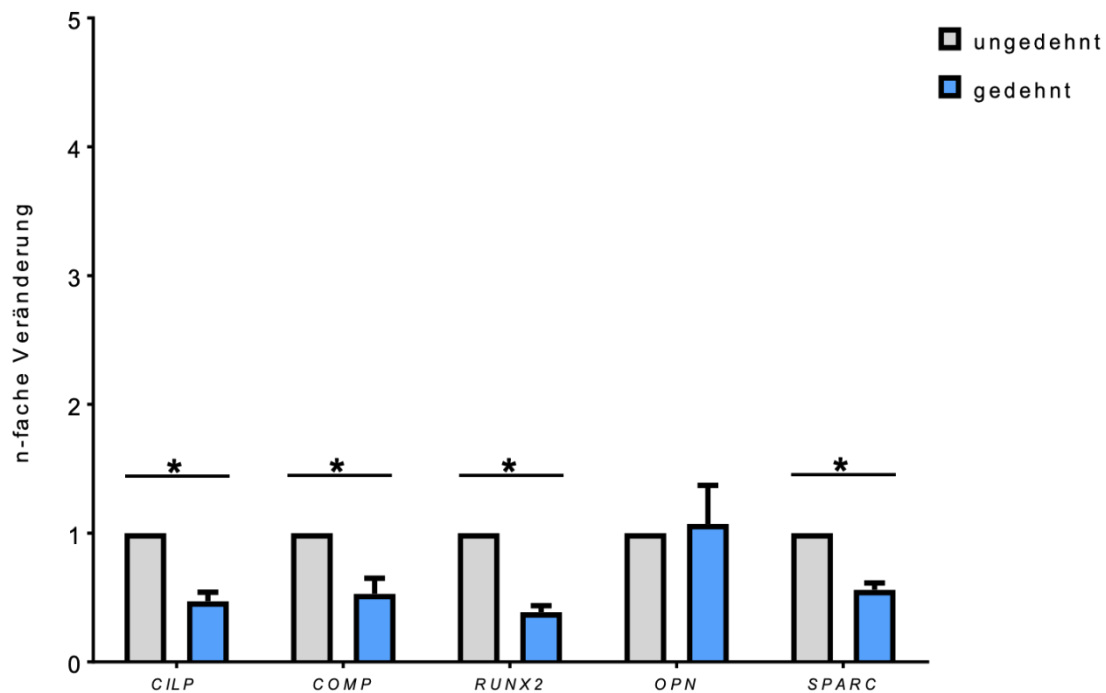
Analysiert wurde die Expression von *CILP*, *COMP*, *RUNX2*, *OPN*, *SPARC*

Darstellung der n-fachen Veränderung der Expression durch Dehnung im Vergleich zu der Expression in nicht gedehnten Zellen auf einer kollagenbeschichteten Membran

Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM, \*:  $p < 0,05$ , Statistik mittels ungepaartem t-Test,  $n=6$  (entspricht technischen Replikaten)

Betrachtete man die Auswirkungen von bi-axialer Dehnung auf kollagenbeschichtetem Untergrund auf die Expression von osteogenen Markern in kardialen Fibroblasten, so konnte nach 4 Stunden Stimulation eine signifikante Erhöhung der Expression von *CILP* und *SPARC* im Vergleich zur Expression in Kontrollzellen beobachtet werden. Die Expression von *RUNX2* zeigte sich in den stimulierten Zellen mit  $0,43 (\pm 0,13)$  signifikant erniedrigt. Für *OPN* und *COMP* ließen sich keine signifikanten Aussagen treffen.

24h



**Abbildung 18: Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von osteogenen Markern nach 24 Stunden bi-axialer Dehnung auf einer kollagenbeschichteten Membran**

Analysiert wurde die Expression von *CILP*, *COMP*, *RUNX2*, *OPN*, *SPARC*

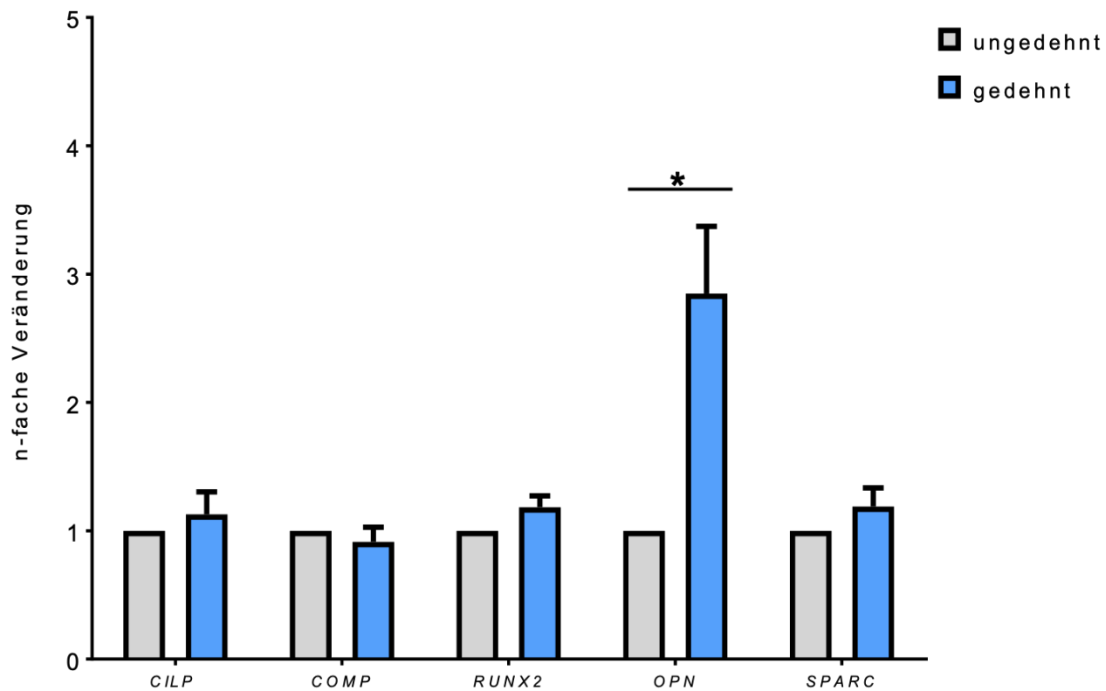
Darstellung der n-fachen Veränderung der Expression durch Dehnung im Vergleich zu der Expression in nicht gedehnten Zellen auf einer kollagenbeschichteten Membran

Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM, \*:  $p < 0,05$ , Statistik mittels ungepaartem t-Test,  $n=6$  (entspricht technischen Replikaten)

Nach 24 Stunden Dehnung war die Expression fast aller osteogenen Marker im Vergleich zur Expression in Kontrollzellen signifikant erniedrigt. Die Veränderung der Expressionen sank dabei je nach Marker auf zwischen das 0,38 – bis 0,55 – fache.

Eine Ausnahme bildete die Expression des Markers *OPN*, bei dem keine signifikante Veränderung der Expression nach 24 Stunden Dehnung zu erkennen war.

48 h



**Abbildung 19: Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von osteogenen Markern nach 48 Stunden bi-axialer Dehnung auf einer kollagenbeschichteten Membran**

Analysiert wurde die Expression von *CILP*, *COMP*, *RUNX2*, *OPN*, *SPARC*

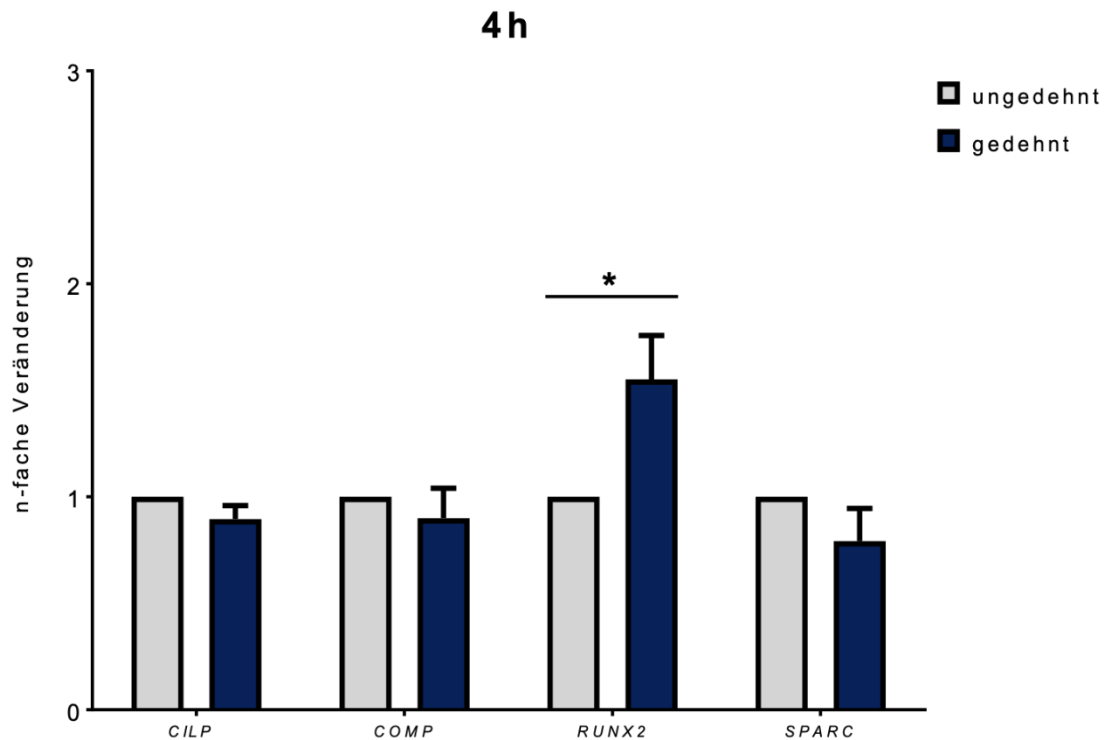
Darstellung der n-fachen Veränderung der Expression durch Dehnung im Vergleich zu der Expression in nicht gedehnten Zellen auf einer kollagenbeschichteten Membran

Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM, \*:  $p < 0,05$ , Statistik mittels ungepaartem t-Test,  $n=6$  (entspricht technischen Replikaten)

48 Stunden nach Stimulationsbeginn, wies die Expression der Mehrzahl der osteogenen Marker im Gegensatz zu den vorherigen Isolationszeitpunkten keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Expression in den Kontrollzellen auf. Diese Entwicklung war für die Marker *CILP*, *COMP*, *RUNX2* und *SPARC* zu beobachten.

Die Expression von *OPN*, die sich zu den früheren Zeitpunkten nicht signifikant verändert zeigte, war nach 48 Stunden durch Dehnung auf das  $3,83 (\pm 1,07)$  – fache erhöht.

### 3.2.5. Veränderungen der Expression von osteogenen Markern in kardialen Fibroblasten auf Transkriptionsebene durch mechanische Dehnung auf einer lamininbeschichteten Matrix



**Abbildung 20: Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von osteogenen Markern nach 4 Stunden bi-axialer Dehnung auf einer lamininbeschichteten Membran**

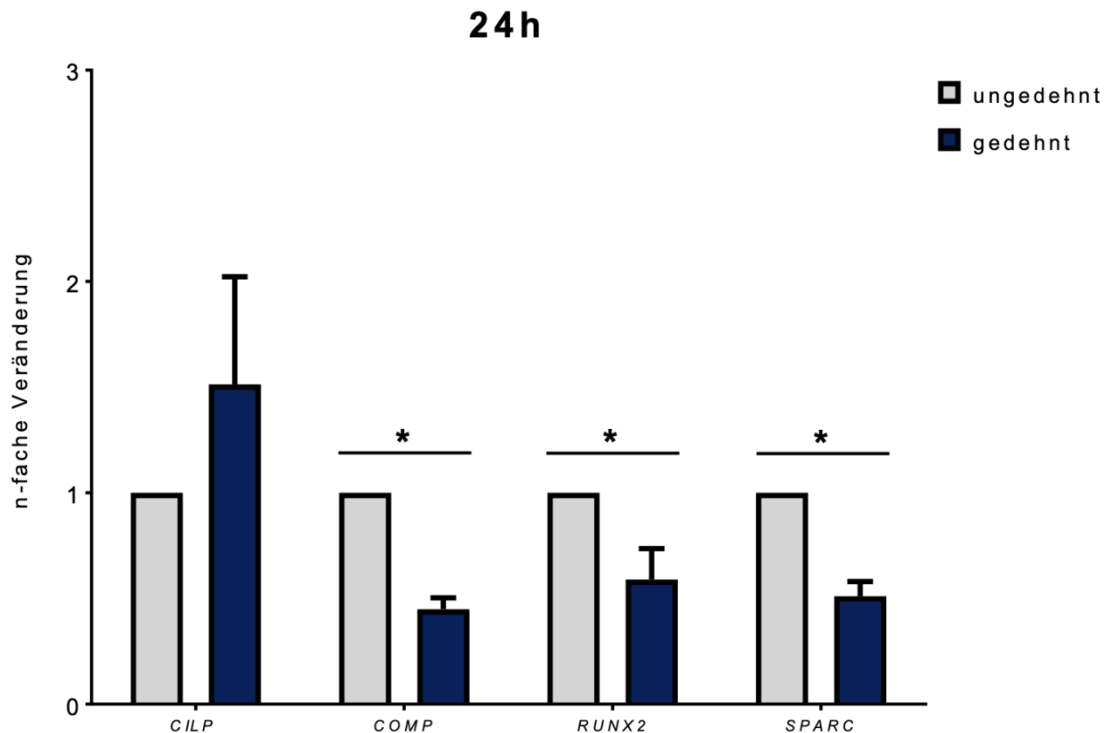
Analysiert wurde die Expression von *CILP*, *COMP*, *RUNX2*, *SPARC*. *OPN* konnte in der qPCR nicht detektiert werden.

Darstellung der n-fachen Veränderung der Expression durch Dehnung im Vergleich zu der Expression in nicht gedehnten Zellen auf einer kollagenbeschichteten Membran

Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM, \*:  $p < 0,05$ , Statistik mittels ungepaartem t-Test,  $n=6$  (entspricht technischen Replikaten)

Durch Dehnung der Zellen auf einem mit Laminin beschichteten Untergrund, kam es nach 4 Stunden zu keinen signifikanten Unterschieden in der Expression von osteogenen Markern im Vergleich zu den Zellen unter Kontrollbedingungen.

Die Expression von *RUNX2* bildete dabei eine Ausnahme, diese betrug in den stimulierten Zellen das 1,55 ( $\pm 0,21$ ) – fache der Expression in den Kontrollzellen und unterschied sich damit signifikant. Zu den unterschiedlichen Isolierungszeitpunkten ließ sich der Marker *OPN* weder in den mechanisch stimulierten noch in den Kontrollzellen nach 40 Zyklen in der qPCR nachweisen.



**Abbildung 21: Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von osteogenen Markern nach 24 Stunden bi-axialer Dehnung auf einer lamininbeschichteten Membran**

Analysiert wurde die Expression von *CILP*, *COMP*, *RUNX2*, *SPARC*. *OPN* konnte in der qPCR nicht detektiert werden

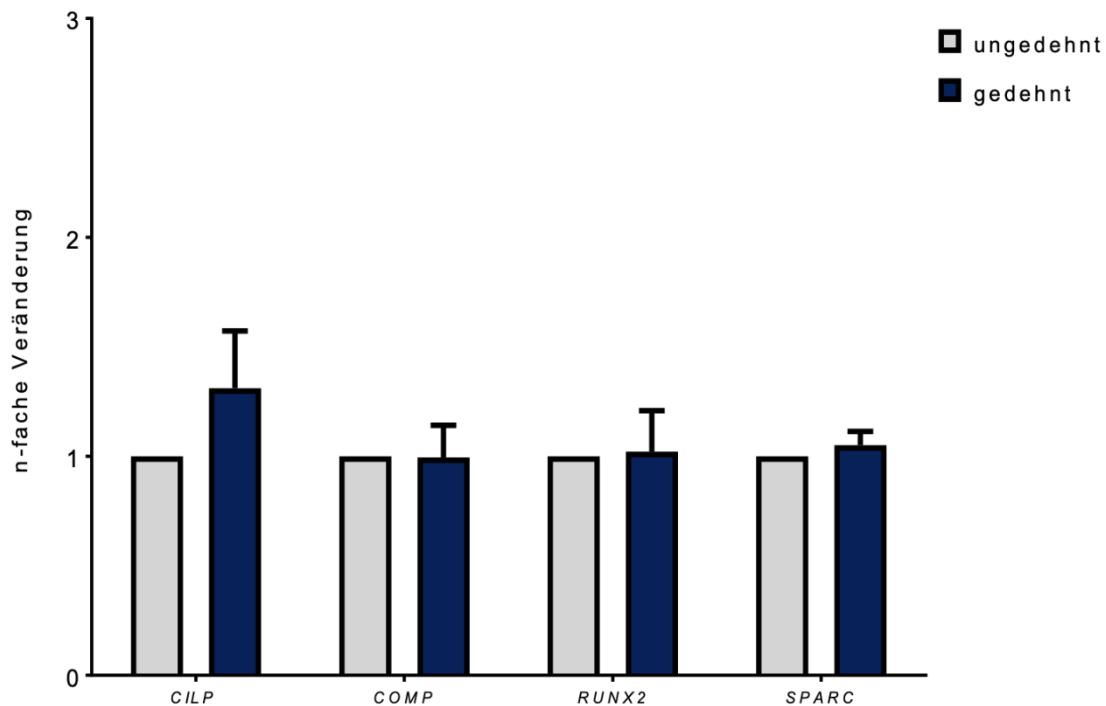
Darstellung der n-fachen Veränderung der Expression durch Dehnung im Vergleich zu der Expression in nicht gedehnten Zellen auf einer kollagenbeschichteten Membran

Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM, \*:  $p < 0,05$ , Statistik mittels ungepaartem t-Test,  $n=6$  (entspricht technischen Replikaten)

Nach 24 Stunden mechanischer Dehnung sank die Expression von *COMP*, *RUNX2* und *SPARC* signifikant unter das Niveau der Expression in den nicht gedehnten Zellen. Die Expression lag zwischen dem 0,45 – und dem 0,59 – fachen der Expression in den Kontrollzellen.

Die Expression des osteogenen Markers *CILP* wurde wie schon nach 4 Stunden auch nach 24 Stunden durch Dehnung nicht signifikant verändert, sondern zeigte ein ähnliches Niveau wie in den Kontrollzellen.

48 h



**Abbildung 22: Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von osteogenen Markern nach 48 Stunden bi-axialer Dehnung auf einer lamininbeschichteten Membran**

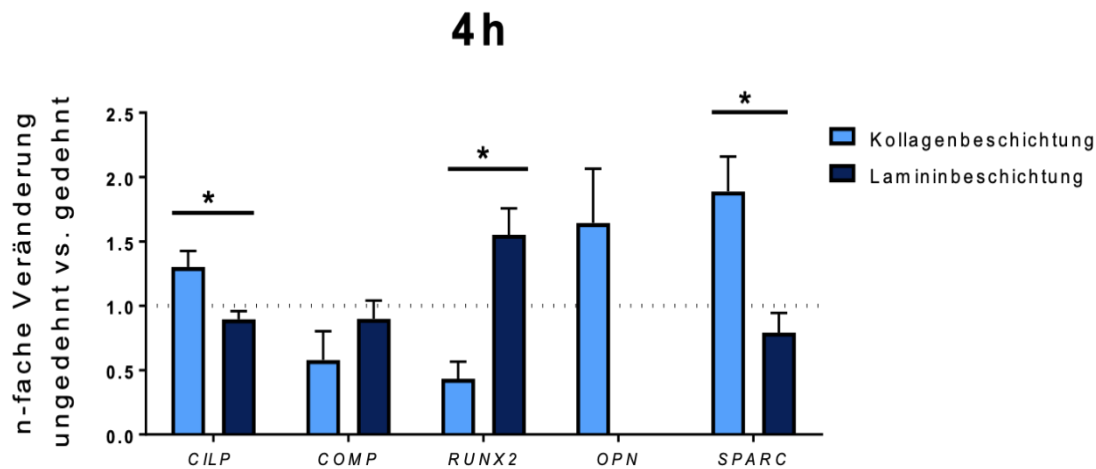
Analysiert wurde die Expression von *CILP*, *COMP*, *RUNX2*, *SPARC*. *OPN* konnte in der qPCR nicht detektiert werden

Darstellung der n-fachen Veränderung der Expression durch Dehnung im Vergleich zu der Expression in nicht gedehnten Zellen auf einer kollagenbeschichteten Membran

Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM, \*:  $p < 0,05$ , Statistik mittels ungepaartem t-Test,  $n=6$  (entspricht technischen Replikaten)

48 Stunden nach Stimulationsbeginn wies die Expression keines der osteogenen Marker eine signifikante Veränderung durch die mechanische Stimulation mittels Dehnung auf. Die Expression der Marker entsprach weitestgehend der in nicht gedehnten Kontrollzellen.

### 3.2.6. Vergleich der Veränderung der Expression von osteogenen Markern auf Transkriptionsebene in Abhängigkeit der Beschichtung der Membran mit Kollagen oder Laminin



**Abbildung 23: Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von osteogenen Markern nach 4 Stunden bi-axialer Dehnung, Vergleich zwischen kollagen- und lamininbeschichteten Membranen**

Analysiert wurden die Unterschiede in der Veränderung der Expression von *CILP*, *COMP*, *RUNX2*, *OPN*, *SPARC*

Darstellung der n-fachen Veränderung der Expression durch Dehnung im Vergleich zu der Expression in nicht gedehnten Zellen auf einer kollagen- bzw. lamininbeschichteten Membran

Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM, \*:  $p < 0,05$ , Statistik mittels ungepaartem t-Test,  $n=6$  (entspricht technischen Replikaten)

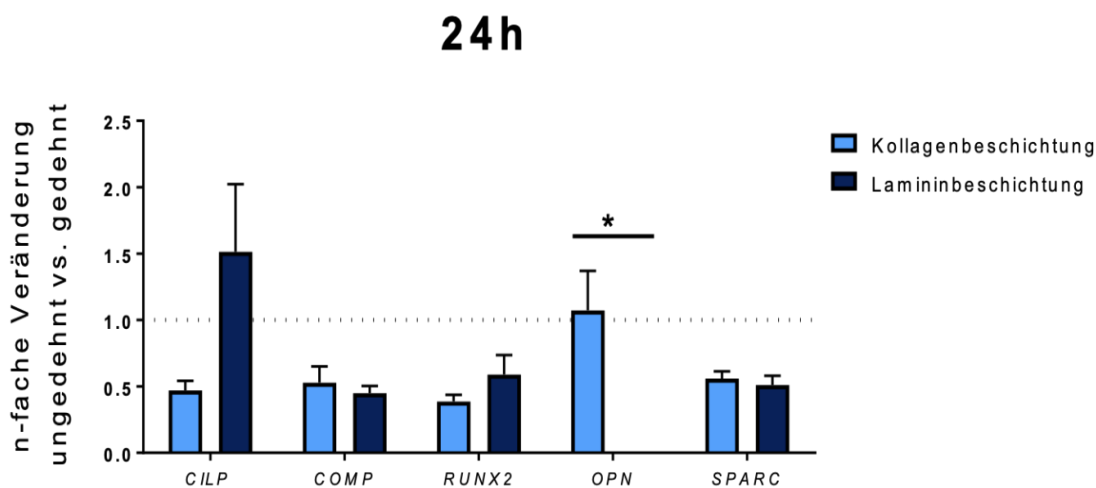
Verglich man die Veränderungen der Expressionen von osteogenen Markern durch Stimulation in Abhängigkeit von der Beschichtung des Untergrundes mit Laminin oder Kollagen nach 4 Stunden, ließ sich ein signifikanter Unterschied bei mehreren Markern feststellen.

Die Expression von *CILP* war in den kardialen Fibroblasten, die auf einer kollagenbeschichteten Membran gedehnt wurden, signifikant erhöht, verglich man sie mit der Expression in Kontrollzellen. Wurden die Zellen auf einer lamininbeschichteten Membran gedehnt, veränderte sich die Expression kaum im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Dadurch ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Beschichtungen und deren Einfluss auf die Expression von *CILP*.

Bei der Expression von *SPARC* zeigte sich ebenfalls eine signifikante Auswirkung der Beschichtung des Untergrundes auf die Veränderung durch Stimulation. In den Zellen, die auf einer Kollagenmatrix gedehnt wurden, stieg die Expression deutlich an, während sie in den Zellen auf lamininbeschichtetem Untergrund keine Veränderung zeigte.

Für den osteogenen Marker *COMP* stellte sich die Veränderung der Expression durch Dehnung unabhängig von der Beschichtung des Untergrundes ähnlich dar, hierbei ließ sich kein signifikanter Einfluss der Beschichtung auf die Expression feststellen.

*OPN* konnte nach 4 Stunden weder in den Kontrollzellen noch in den mechanisch stimulierten Zellen auf mit Laminin beschichteten Membranen in der qPCR gemessen werden. Anders in den Zellen, die auf einer mit Kollagen beschichteten Membran gedehnt wurden. Hier stieg die Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen an. Dadurch ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden unterschiedlichen Beschichtungen. Dieser Sachverhalt ließ sich auch nach 24 und 48 Stunden Stimulation durch mechanische Dehnung beobachten.



**Abbildung 24: Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von osteogenen Markern nach 24 Stunden bi-axialer Dehnung, Vergleich zwischen kollagen- und lamininbeschichteten Membranen**

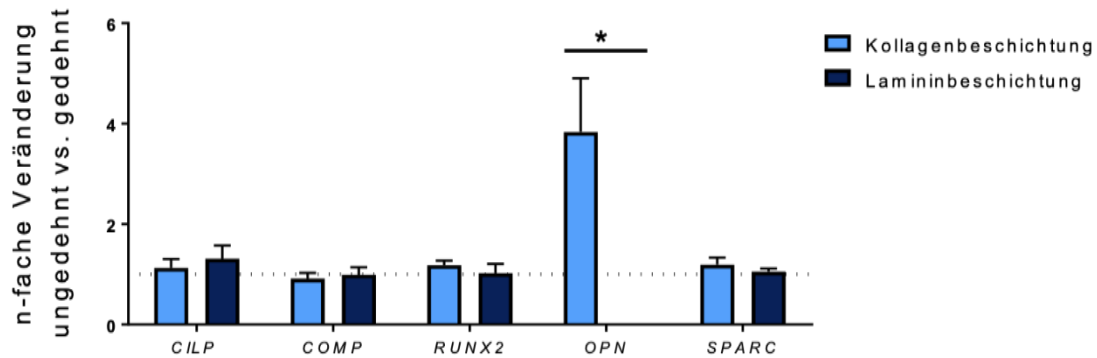
Analysiert wurden die Unterschiede in der Veränderung der Expression von *CILP*, *COMP*, *RUNX2*, *OPN*, *SPARC*

Darstellung der n-fachen Veränderung der Expression durch Dehnung im Vergleich zu der Expression in nicht gedehnten Zellen auf einer kollagen- bzw. lamininbeschichteten Membran

Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM, \*:  $p < 0,05$ , Statistik mittels ungepaartem t-Test,  $n=6$  (entspricht technischen Replikaten)

Nach 24 Stunden Stimulation ließ sich kein signifikanter Einfluss der unterschiedlichen Beschichtungen auf die Veränderung der Expression von osteogenen Markern nachweisen. Unabhängig von der Beschichtung zeigte sich bei beiden Untergründen ein Absinken der Expression durch mechanische Dehnung. Ausnahme bildete der Marker *OPN* aufgrund des oben beschriebenen Sachverhalts.

48 h



**Abbildung 25: Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von osteogenen Markern nach 48 Stunden bi-axialer Dehnung, Vergleich zwischen kollagen- und lamininbeschichteten Membranen**

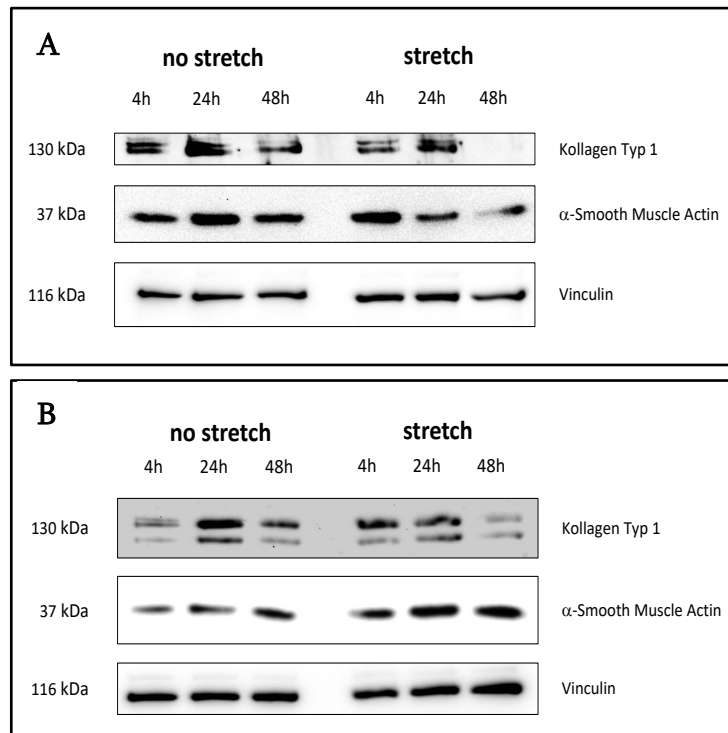
Analysiert wurden die Unterschiede in der Veränderung der Expression von *CILP*, *COMP*, *RUNX2*, *OPN*, *SPARC*

Darstellung der n-fachen Veränderung der Expression durch Dehnung im Vergleich zu der Expression in nicht gedehnten Zellen auf einer kollagen- bzw. lamininbeschichteten Membran

Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM, \*:  $p < 0,05$ , Statistik mittels ungepaartem t-Test,  $n=6$  (entspricht technischen Replikaten)

Zum letzten Isolierungszeitpunkt nach 48 Stunden, zeigten sich wie schon nach 24 Stunden keine signifikanten Unterschiede der Veränderung der Expression von osteogenen Markern durch unterschiedliche Beschichtungen der Membranen.

### 3.2.7. Veränderungen der Proteinexpression in kardialen Fibroblasten nach mechanischer Dehnung auf einer kollagenbeschichteten Matrix



**Abbildung 26: SDS-Page zur Analyse der Proteinexpression in kardialen Fibroblasten in Abhängigkeit von mechanischer Stimulation durch bi-axiale Dehnung auf einer kollagenbeschichteten Membran**

Isolation der Zellen nach 4, 24 und 48 Stunden, Vergleich mit Zellen unter Kontrollbedingungen ohne mechanische Stimulation

Analyse der Proteine Kollagen Typ 1 und  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin, Vinculin als Referenzen

Darstellung von zwei unabhängigen Durchgängen: Durchgang 1 (A) und Durchgang 2 (B)

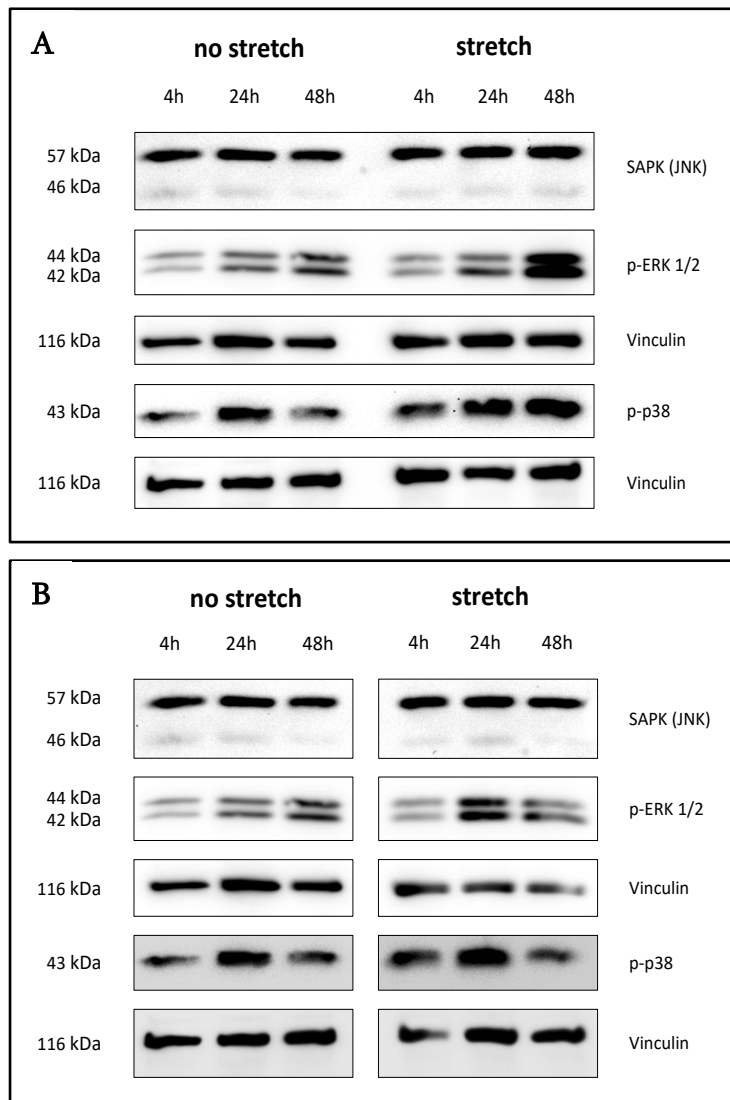
Betrachtet man die Auswirkungen von bi-axialer Dehnung auf Proteinexpressionsebene in kardialen Fibroblasten, ließen sich Veränderungen durch die mechanische Stimulation feststellen. In Durchgang 1 stieg die Expression von Kollagen Typ 1 sowohl in den durch Dehnung auf einer kollagenbeschichteten Membran stimulierten Zellen, als auch in den nicht gedehnten Zellen nach 24 Stunden im Vergleich zur Expression nach 4 Stunden an, bevor sie nach 48 Stunden wieder absank und in den gedehnten Zellen nicht mehr nachweisbar war. Dabei ließ sich ein leichter Trend erkennen, der eine höhere Expression in den nicht stimulierten Zellen im Vergleich zu den stimulierten Zellen zeigte.

Die Expression von  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin stieg in den nicht stimulierten Zellen nach 24 Stunden im Vergleich zum früheren 4-Stunden-Zeitpunkt an, nach 48 Stunden kehrte sie ungefähr auf das Niveau der Expression nach 4 Stunden zurück. In den stimulierten

Zellen war die Expression nach 4 Stunden am höchsten im Vergleich zu den späteren Zeitpunkten. Vergleich man stimulierte und nicht stimulierte Zellen, exprimierten die stimulierten Zellen nach 4 Stunden mehr  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin als die nicht stimulierten Zellen. Nach 24 und 48 Stunden war die Expression in den nicht stimulierten Zellen höher als in den stimulierten Zellen.

In Durchgang 2 stieg die Expression von Kollagen Typ 1 in den nicht stimulierten Zellen nach 24 Stunden im Vergleich zur Expression nach 4 Stunden deutlich an, bevor sie nach 48 Stunden wieder absank. Zu diesem Zeitpunkt war sie jedoch noch höher als nach 4 Stunden. In den gedehnten Zellen blieb die Expression von Kollagen Typ 1 nach 4 und 24 Stunden konstant, nach 48 Stunden war Kollagen Typ 1 nur noch schwach nachweisbar. Vergleich man gedehnte und nicht gedehnte Zellen, war die Expression nach 4 Stunden in den stimulierten Zellen höher, die späteren Zeitpunkte zeigten eine höhere Expression in den nicht stimulierten Zellen.

Für  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin gab es in den nicht stimulierten Zellen eine Tendenz, dass sich die Expression mit der Zeit steigerte. Diese Tendenz war auch in den stimulierten Zellen erkennbar, wobei die Expressionen nach 24 und 48 Stunden unter beiden Bedingungen vergleichsweise ähnlich waren. Zu allen drei Isolierungszeitpunkten war die Expression in den gedehnten Zellen verglichen mit den nicht stimulierten Zellen höher.



**Abbildung 27: SDS-Page zur Analyse der Proteinexpression in kardialen Fibroblasten in Abhängigkeit von mechanischer Stimulation durch bi-axiale Dehnung auf einer kollagenbeschichteten Membran**

Isolation der Zellen nach 4, 24 und 48 Stunden, Vergleich mit Zellen unter Kontrollbedingungen ohne mechanische Stimulation

Analyse der Proteine SAPK (JNK), p-ERK 1/2, p-p38, Vinculin als Referenzgen

Darstellung von zwei unabhängigen Durchgängen: Durchgang 1 (A) und Durchgang 2 (B)

In Durchgang 1 war die Expression von SAPK (JNK) unter Stimulationsbedingungen zu allen Zeitpunkten vergleichbar. Auch im Vergleich zu den Zellen unter Kontrollbedingungen zeigte sich kein relevanter Unterschied zu den jeweiligen Zeitpunkten. Diese Beobachtung ließ sich auch im 2. Durchgang beschreiben.

p-ERK 1/2 stieg sowohl in den gedehnten als auch in den nicht gedehnten im zeitlichen Verlauf an. Zum Isolationszeitpunkt nach 48 Stunden, zeigte sich ein starker Anstieg der Proteinexpression von p-ERK 1/2 sowohl verglichen mit den vorherigen Isolationszeitpunkten als auch mit der Expression in den Kontrollzellen zum Zeitpunkt

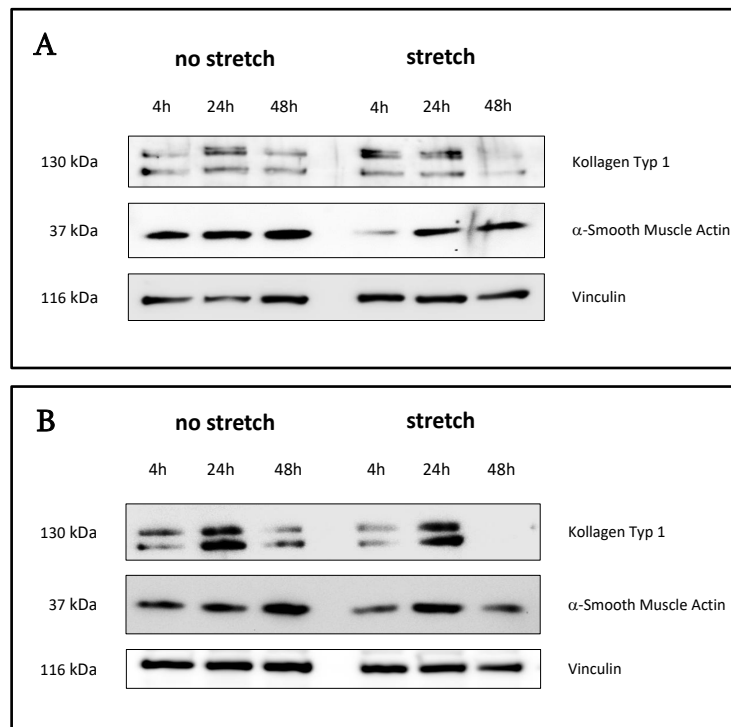
nach 48 Stunden. Dieses Ergebnis ließ sich in Durchgang 2 nicht vollständig wiederholen. Hier stieg die Expression von p-ERK 1/2 nach 24 Stunden verglichen mit dem 4 Stunden Isolationszeitpunkt an und zeigte sich auch in Anbetracht der Zellen unter Kontrollbedingungen erhöht. Nach 48 Stunden fiel die Proteinexpression wieder ab und war ähnlich der der Kontrollzellen.

Die Expression von p-p38 MAPK stieg in den nicht stimulierten Zellen nach 24 Stunden im Vergleich zum vorherigen Isolationszeitpunkt nach 4 Stunden auf ein höheres Niveau an. Anschließend sank diese nach 48 Stunden wieder auf das Niveau der Expression nach 4 Stunden Stimulation ab. Auch in den Zellen, die dem Stimulus mechanische Dehnung ausgesetzt waren, stieg die Expression von p-p38 MAPK nach 24 Stunden verglichen mit der Expression nach 4 Stunden an, im Gegensatz zu den Zellen unter Kontrollbedingungen blieb das Niveau auch zum 48 Stunden Isolationszeitpunkt konstant und sank nicht ab.

Der Verlauf der Expression von p-p38 MAPK in stimulierten Zellen zeigte eine ähnliche Dynamik im 2. Durchgang des Versuchs. Eine Differenz zeigte sich beim Isolationszeitpunkt nach 48 Stunden in den Zellen, die der Stimulation ausgesetzt waren. Hier sank die Expression von p-p38 MAPK wieder ab auf ein ähnliches Niveau wie nach 4 Stunden Stimulation.

Für die Proteine p-SAPK (JNK), p-p65 und p-Smad 2/3 konnte in beiden Durchläufen kein Signal in der SDS-Page detektiert werden.

### 3.2.8. Veränderungen der Proteinexpression in kardialen Fibroblasten nach mechanischer Dehnung auf einer lamininbeschichteten Matrix



**Abbildung 28: SDS-Page zur Analyse der Proteinexpression in kardialen Fibroblasten in Abhängigkeit von mechanischer Stimulation durch bi-axiale Dehnung auf einer lamininbeschichteten Membran**

Isolation der Zellen nach 4, 24 und 48 Stunden, Vergleich mit Zellen unter Kontrollbedingungen ohne mechanische Stimulation

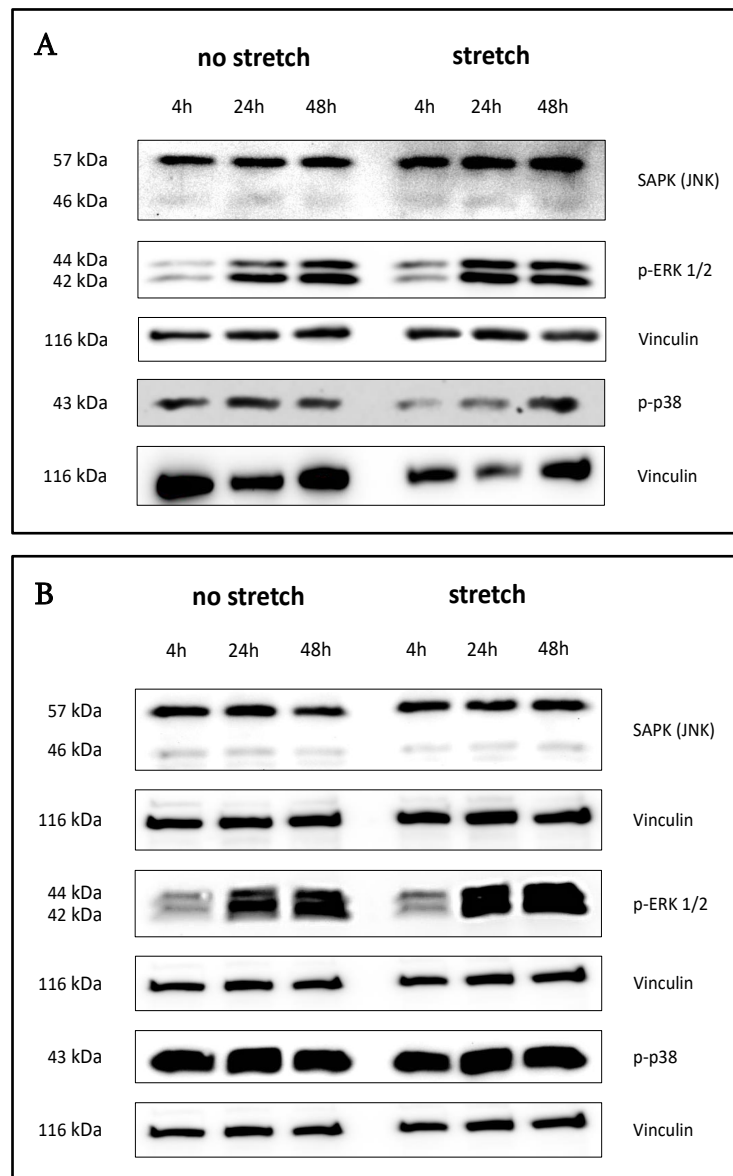
Analyse der Proteine Kollagen Typ 1 und α-Smooth Muscle Actin, Vinculin als Referenzgen

Darstellung von zwei unabhängigen Durchgängen: Durchgang 1 (A) und Durchgang 2 (B)

In den Zellen, die auf einer mit Laminin beschichteten Membran gedehnt wurden, blieb die Expression von Kollagen Typ 1 nach 4 und 24 Stunden ähnlich. Nach 4 Stunden konnte eine minimale Erhöhung der Expression durch die Stimulation beobachtet werden, zum nächstspäteren Isolationszeitpunkt glichen sich die Niveaus jedoch wieder an, da die Expression in den Kontrollzellen einen leichten Anstieg zeigte. Unter beiden Bedingungen sank die Kollagen Typ 1- Expression im Anschluss ab. Bei der erneuten Messung der Proteinexpression in Durchgang 2 zeigte sich hingegen sowohl in den stimulierten als auch in den nicht stimulierten Zellen eine deutliche Erhöhung der Expression nach 24 Stunden, verglich man sie mit den jeweiligen Messungen nach 4 Stunden. Die Analyse nach 48 Stunden zeigte dann ein Abfallen der Expression unter

beiden Bedingungen. Dabei fiel sie in den stimulierten Zellen unter die Grenze der Nachweisbarkeit.

Die Expression von  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin blieb im 1. Durchgang in den Kontrollzellen über den gesamten Verlauf von 48 Stunden annähernd konstant. Dabei war die Expression nach 4 Stunden in den Kontrollzellen höher als in den stimulierten Zellen, nach 24 und 48 Stunden näherten sich die Niveaus der Proteinexpression zwischen Kontroll- und Stimulationszellen an. In Durchgang 2 zeigte sich in den Kontrollzellen ein Anstieg der Expression von  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin nach 48 Stunden, dieser war ausgeprägter als in Durchgang 1. In den stimulierten Zellen hingegen ließ sich in Diskrepanz zum 1. Durchgang erst ein Anstieg der Expression nach 24 Stunden beobachten, bevor die Expression nach 48 Stunden absank und unter die Expression in den Kontrollzellen fiel.



**Abbildung 29: SDS-Page zur Analyse der Proteinexpression in kardialen Fibroblasten in Abhängigkeit von mechanischer Stimulation durch bi-axiale Dehnung auf einer lamininbeschichteten Membran**

Isolation der Zellen nach 4, 24 und 48 Stunden, Vergleich mit Zellen unter Kontrollbedingungen ohne mechanische Stimulation

Analyse der Proteine SAPK (JNK), p-ERK 1/2, p-p38, Vinculin als Referenzen

Darstellung von zwei unabhängigen Durchgängen: Durchgang 1 (A) und Durchgang 2 (B)

Die Expression von SAPK (JNK) blieb wie schon bei den Zellen auf einem mit Kollagen beschichteten Untergrund, sowohl in den mechanisch gedehnten als auch in den Kontrollzellen auf Lamininmembran konstant. Auch die Expression von p-ERK 1/2 wies Ähnlichkeiten mit der Kollagenbeschichtung auf. Während die Expression nach 4 Stunden sowohl in gedehnten als auch nicht gedehnten Zellen schwach war, stieg sie nach 24 Stunden stark an und blieb nach 48 Stunden auf konstant hohem Niveau.

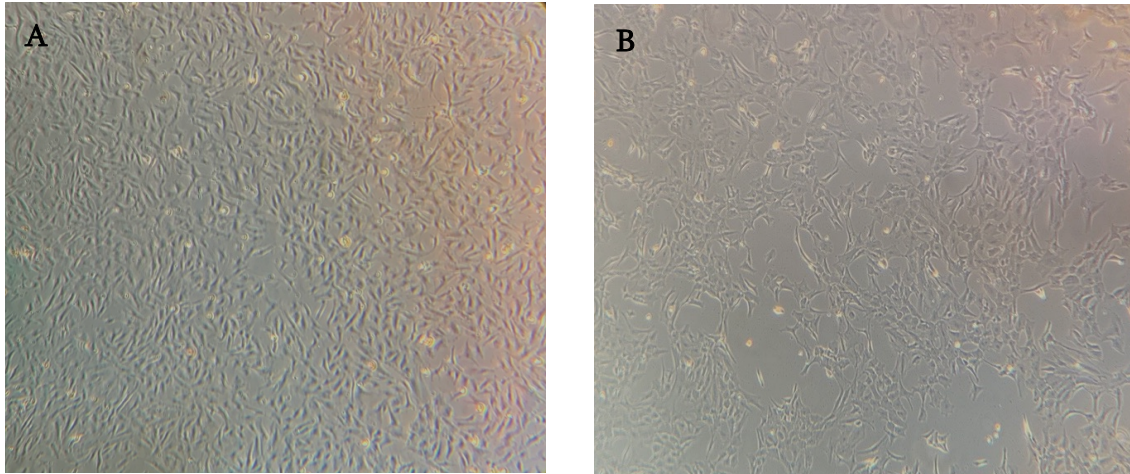
Auch im zweiten Durchlauf war die Expression von SAPK (JNK) zu jedem Zeitpunkt auf einem konstanten Niveau und kein signifikanter Unterschied zwischen gedehnten und nicht gedehnten Zellen erkennbar. P-ERK 1/2 war nach 4 Stunden unter beiden Bedingungen ähnlich, bevor die Expression nach 24 Stunden in beiden anstieg, wobei der Anstieg in den gedehnten Zellen höher ausfiel. Dies entsprach der Analyse aus Durchgang 1. Die Expression von p-p38 stieg in gedehnten und ungedehnten Zellen nach 24 Stunden schwach an und sank nach 48 Stunden auf das Niveau von 4 Stunden. Ein signifikanter Unterschied zwischen gedehnt und ungedehnt war nicht erkennbar.

Für p-SAPK (JNK), p-p65 und p-Smad 2/3 konnte in beiden Durchläufen kein Signal detektiert werden.

### 3.3. Mechanische Stimulation durch Steifheit des Untergrundes

#### 3.3.1. Morphologie der Zellen

Betrachtete man die Zellen nach 3 Tagen auf dem Hydrogel mit 12 kPa bzw. 50 kPa Porengröße unter dem Lichtmikroskop, so fiel eine verringerte Zelldichte auf dem Hydrogel mit 50 kPa Porengröße auf. Zudem bildeten die Zellen ausgeprägte längliche Ausläufer, mit denen sie zellfreie Räume überbrückten.

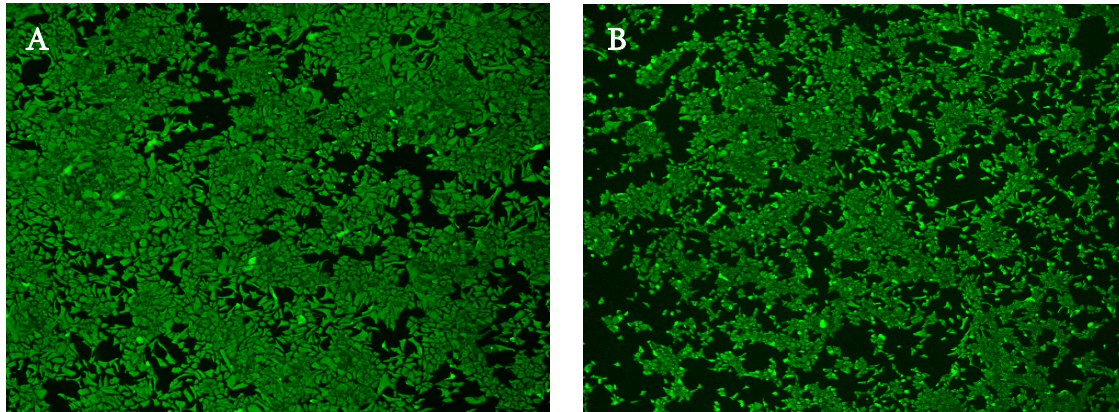


**Abbildung 30: Mikroskopische Betrachtung von kardialen Fibroblasten in Kultur mit Hydrogelbeschichtung**

**A** nach 3 Tagen auf Hydrogelbeschichtung mit 12 kPa Porengröße

**B** nach 3 Tagen auf Hydrogelbeschichtung mit 50 kPa Porengröße

Um Veränderungen der Morphologie der kardialen Fibroblasten durch das Wachstum auf Hydrogel mit unterschiedlichen Porengrößen genauer analysieren zu können, wurde nach 3 Tagen eine Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen Vimentin durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde mit Exzitationslicht im grünen Bereich angeregt. Auch hier fiel die geringere Zelldichte auf der Hydrogelbeschichtung mit 50 kPa Porengröße auf.



**Abbildung 31: Mikroskopische Betrachtung von kardialen Fibroblasten in Kultur auf Hydrogelbeschichtung mittels Immunfluoreszenzfärbung**

Grün = fluoreszierender Antikörper gegen Vimentin

**A** nach 3 Tagen auf Hydrogelbeschichtung mit 12 kPa Porengröße

**B** nach 3 Tagen auf Hydrogelbeschichtung mit 50 kPa Porengröße

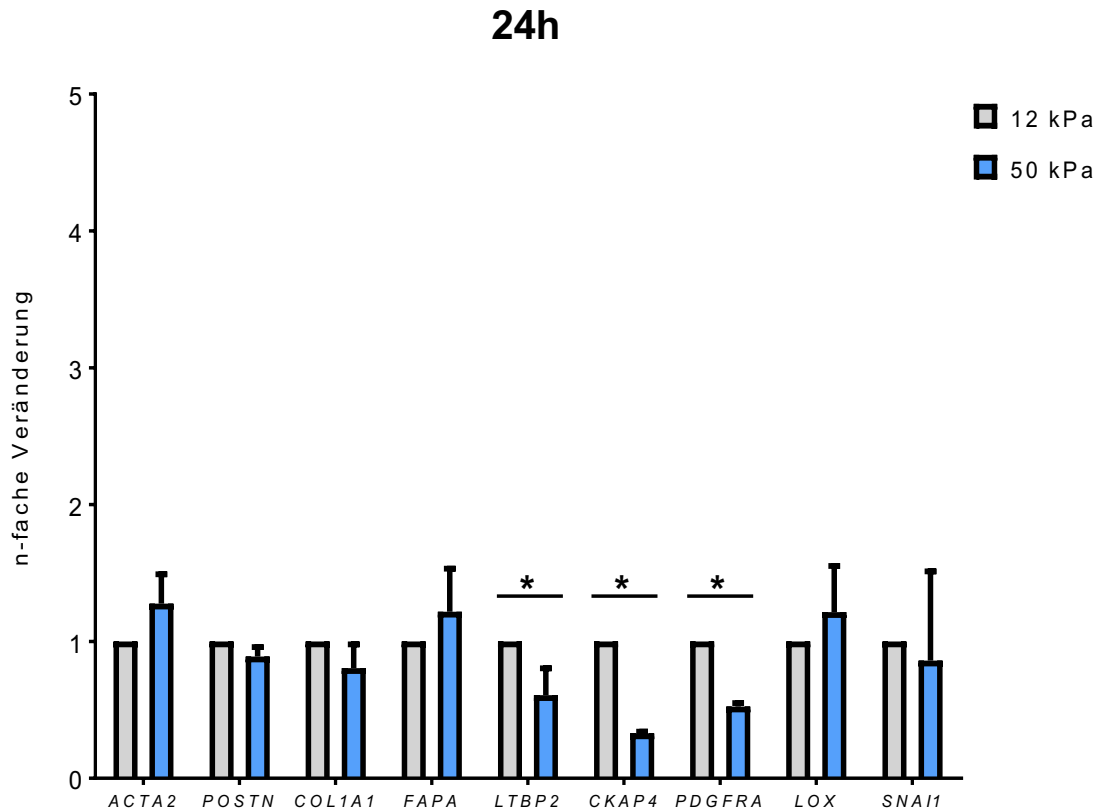
### **3.3.2. Veränderung der Expression von kardialen Fibroblasten durch Variation der Steifheit des Untergrundes**

Um die Auswirkungen der Untergrundsteifheit auf kardiale Fibroblasten zu untersuchen, wurden Fibroblasten auf Hydrogelen mit verschiedenen Porengrößen kultiviert. Dabei entsprach die Steifheit eines Hydrogels mit einer Porengröße von 12 kPa der von physiologischem Herzgewebe und einer Porengröße von 50 kPa der von fibrotischem Gewebe. Nach 24, 48 und 72 Stunden Kultivierung der Zellen auf den entsprechenden Hydrogelen, wurden die Zellen geerntet.

Die Analyse der Veränderungen der Expression verschiedener Gene durch erhöhte Steifheit des Untergrundes erfolgte auf Ebene der Transkription. Hierfür wurde die mRNA aus den geernteten Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Durch qPCR wurde die Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern und von osteogenen Markern untersucht.

Um mögliche Veränderungen der Expression von Aktivierungsmarkern auf Translationsebene zu analysieren, wurden zusätzlich SDS-Pages hergestellt und entwickelt.

### 3.3.2.1. Veränderungen der Expression von Aktivierungsmarkern in kardialen Fibroblasten auf Transkriptionsebene durch Variation der Steifheit des Untergrundes



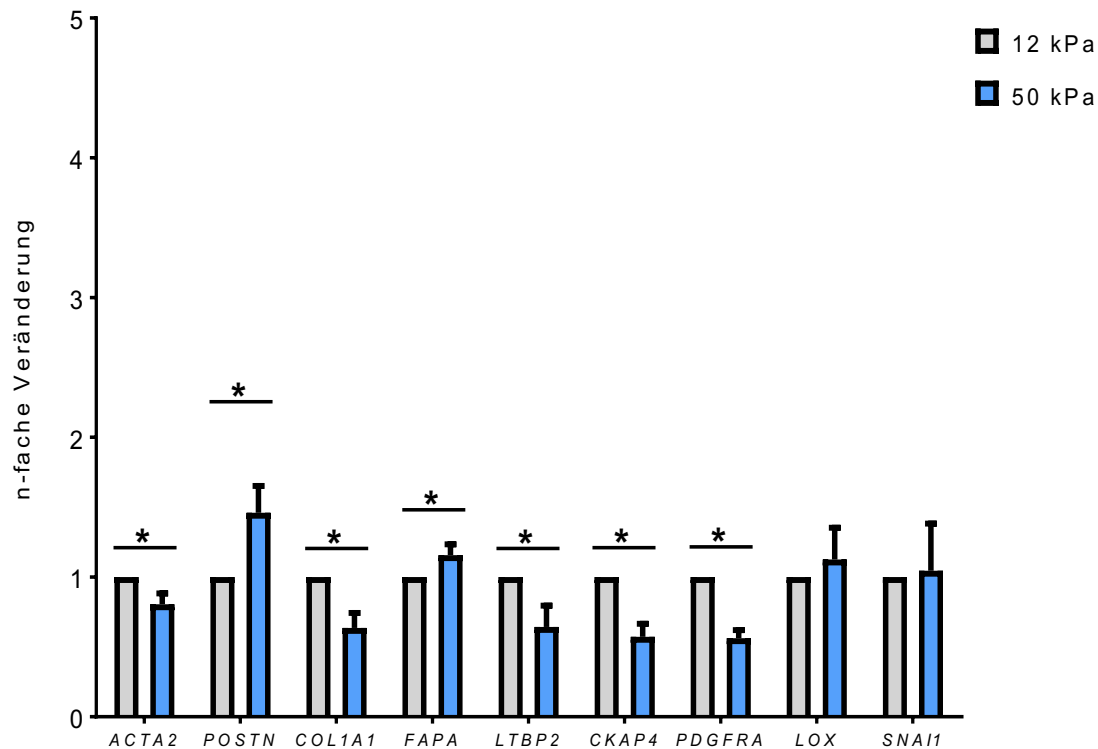
**Abbildung 32: Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern nach 24 Stunden Kultivierung auf Hydrogelen verschiedener Porengrößen**

Analysiert wurde die Expression von *ACTA2*, *POSTN*, *COL1A1*, *FAPA*, *LTBP2*, *CKAP4*, *PDGFRA*, *LOX* und *SNAI1* in kardialen Fibroblasten jeweils auf Hydrogelen mit der Porengröße 12 bzw. 50 kPa. Darstellung der n-fachen Veränderung der Expression in kardialen Fibroblasten auf 50 kPa Hydrogelen im Vergleich zu 12 kPa Hydrogelen.

Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$ , Statistik mittels ungepaartem t-Test,  $n=9$  (entspricht technischen Replikaten).

Betrachtet wurde die Expression von Aktivierungsmarkern nach 24, 48 und 72 Stunden Kultivierung auf Hydrogelen. Dabei zeigten sich nach 24 Stunden keine signifikanten Unterschiede der Expression von *ACTA2*, *POSTN*, *COL1A1*, *FAPA*, *LOX* und *SNAI1* zwischen den Zellen, die auf 12 kPa Hydrogelen kultiviert wurden und denen, die auf 50 kPa wuchsen. Anders die Auswirkungen auf die Marker *LTBP2*, *CKAP4* und *PDGFRA*. Hier sank die Expression durch die erhöhte Steifheit des Untergrundes signifikant und betrug zwischen dem 0,33 – und 0,61 – fachen der Expression in kardialen Fibroblasten, die einer geringeren Steifheit ausgesetzt waren.

48h



**Abbildung 33: Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern nach 48 Stunden Kultivierung auf Hydrogelen verschiedener Porengrößen**

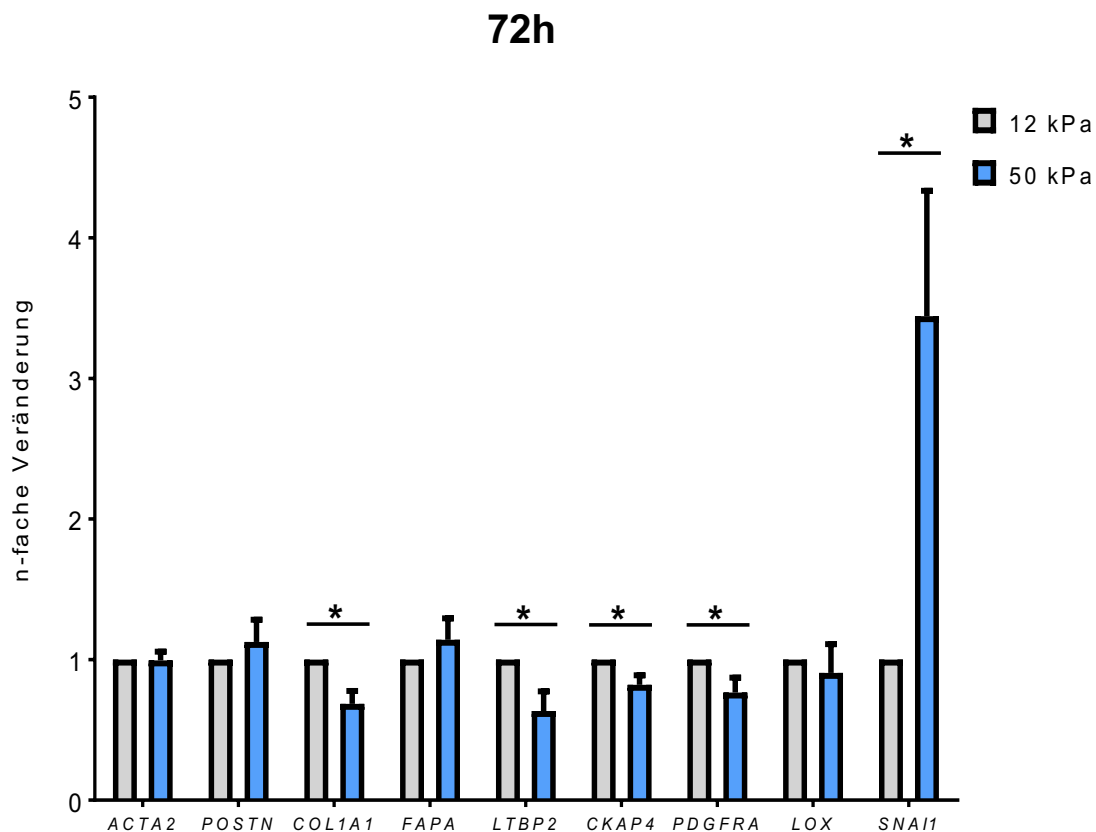
Analysiert wurde die Expression von *ACTA2*, *POSTN*, *COL1A1*, *FAPA*, *LTBP2*, *CKAP4*, *PDGFRA*, *LOX* und *SNAI1* in kardialen Fibroblasten jeweils auf Hydrogelen mit der Porengröße 12 bzw. 50 kPa. Darstellung der n-fachen Veränderung der Expression in kardialen Fibroblasten auf 50 kPa Hydrogelen im Vergleich zu 12 kPa Hydrogelen.

Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$ , Statistik mittels ungepaartem t-Test,  $n=9$  (entspricht technischen Replikaten).

48 Stunden nach Beginn der Stimulation, war die Expression eines Großteils der Aktivierungsmarker durch die erhöhte Steifheit der Hydrogele mit 50 kPa Porengröße signifikant verändert. Ausnahmen bildeten die Marker *LOX* und *SNAI1*, für deren Expression sich kein signifikanter Unterschied zwischen Zellen, die auf 50 kPa Hydrogelen und Zellen, die auf 12 kPa Hydrogelen kultiviert wurden, feststellen ließ.

*ACTA2* und *COL1A1* wurden durch die erhöhte Steifheit signifikant niedriger exprimiert. Die Expression sank auf das  $0,80 (\pm 0,08)$  – bzw. das  $0,64 (\pm 0,11)$  – fache der Expression in Zellen, die einer geringeren mechanischen Belastung ausgesetzt waren. Auch die Marker *LTBP2*, *CKAP4* und *PDGFRA* wurden, wie schon nach 24 Stunden zu beobachten war, geringer exprimiert.

Signifikante war außerdem die Erhöhung der Expression von *POSTN* und *FAPA*. In den Fibroblasten, die auf 50 kPa Hydrogelen kultiviert wurden, stieg die Expression von *POSTN* auf das  $1,46 \pm 0,19$  – fache an, während die Expression von *FAPA* auf das  $1,16 (\pm 0,08)$  – fache anstieg.



**Abbildung 34: Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern nach 72 Stunden Kultivierung auf Hydrogelen verschiedener Porengrößen**

Analysiert wurde die Expression von *ACTA2*, *POSTN*, *COL1A1*, *FAPA*, *LTBP2*, *CKAP4*, *PDGFRA*, *LOX* und *SNAI1* in kardialen Fibroblasten jeweils auf Hydrogelen mit der Porengröße 12 bzw. 50 kPa

Darstellung der n-fachen Veränderung der Expression in kardialen Fibroblasten auf 50 kPa Hydrogelen im Vergleich zu 12 kPa Hydrogelen

Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$ , Statistik mittels ungepaartem t-Test,  $n=9$  (entspricht technischen Replikaten)

Zum letzten Isolierungszeitpunkt nach 72 Stunden war die Expression von *COL1A1* in den Zellen, die auf 50 kPa Hydrogel kultiviert wurden, signifikant niedriger, als in den Zellen, die auf 12 kPa Hydrogelen ausgesät wurden. Der Rückgang der Expression auf das 0,68 -fache war ähnlich der Veränderung nach 48 Stunden. Auch *LTBP2*, *CKAP4* und

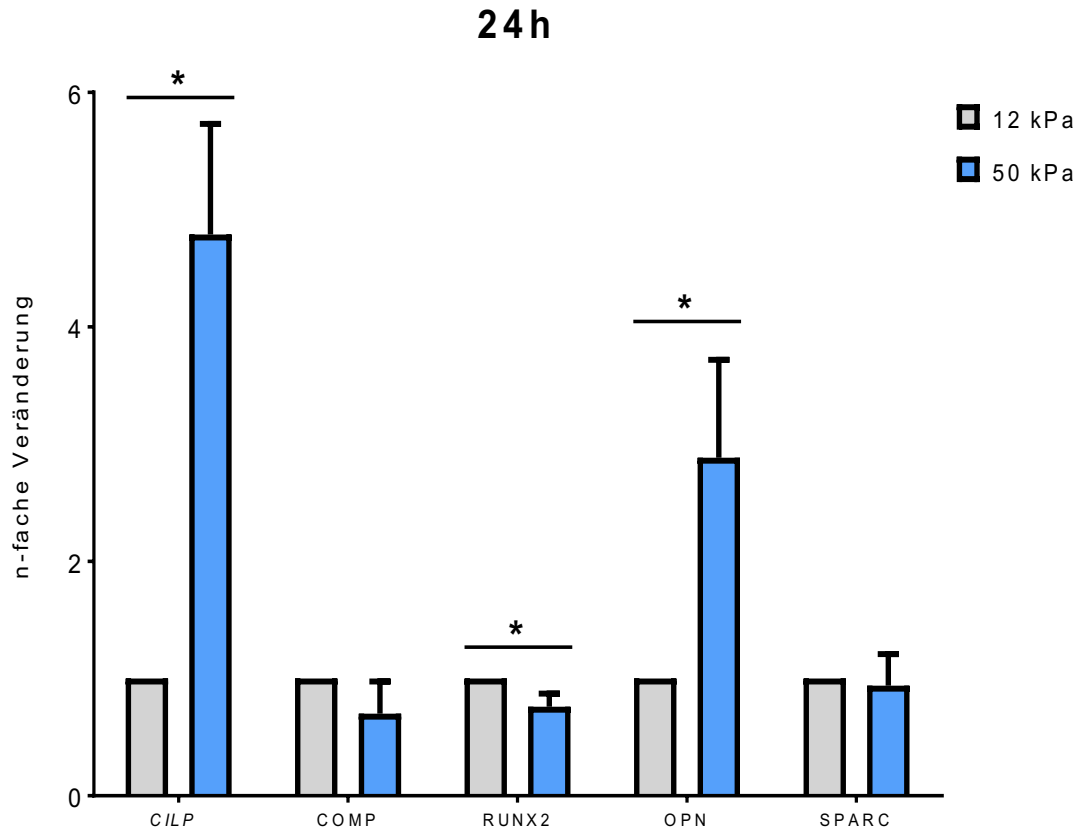
*PDGFRA* wurden wie schon zu den beiden früheren Zeitpunkten durch höhere mechanische Belastung, weniger stark exprimiert.

Auffällig war die Steigerung der Expression von *SNAIL* aufgrund der höheren Steifheit.

Die Expression stieg auf das 4,39 ( $\pm 1,23$ ) – fache an.

Nachdem nach 48 Stunden signifikante Unterschiede in der Expression von *ACTA2*, *POSTN* und *FAPA* erkennbar waren, ließ sich nach 72 Stunden wie schon nach 24 Stunden kein signifikanter Unterschied mehr erkennen. Die Expression von *LOX* wies auch nach 72 Stunden keine Veränderung auf.

### 3.3.2.2. Veränderungen der Expression von osteogenen Markern in kardialen Fibroblasten auf Transkriptionsebene durch Variation der Steifheit des Untergrundes



**Abbildung 35: Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von osteogenen Markern nach 24 Stunden Kultivierung auf Hydrogelen verschiedener Porengrößen**

Analysiert wurde die Expression von *CILP*, *COMP*, *RUNX2*, *OPN*, *SPARC* in kardialen Fibroblasten jeweils auf Hydrogelen mit der Porengröße 12 bzw. 50 kPa

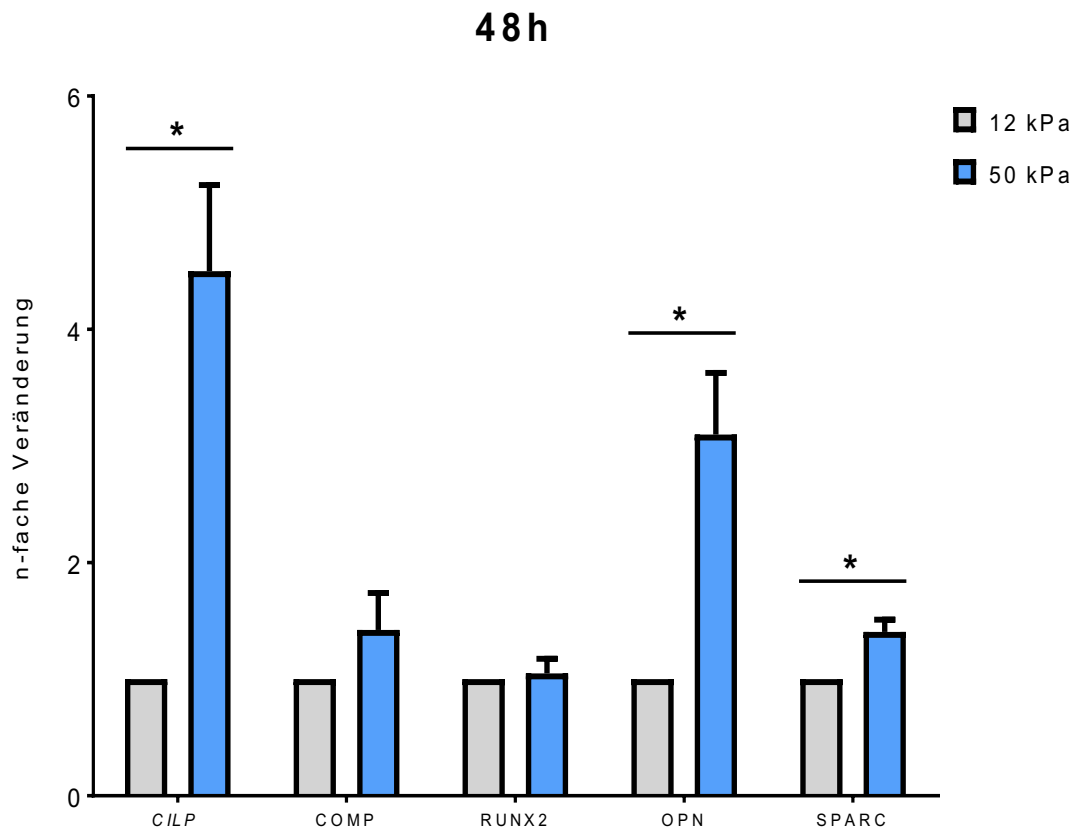
Darstellung der n-fachen Veränderung der Expression in kardialen Fibroblasten auf 50 kPa Hydrogelen im Vergleich zu 12 kPa Hydrogelen

Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$ , Statistik mittels ungepaartem t-Test,  $n=9$  (entspricht technischen Replikaten)

Neben den Auswirkungen unterschiedlicher Porengrößen des Untergrundes auf die Expression von Aktivierungsmarkern, wurden auch die Auswirkungen auf die Expression von osteogenen Markern untersucht. Durch Kultivierung auf einem Hydrogel mit einer Porengröße von 50 kPa kam es in den Fibroblasten nach 24 Stunden zu einem signifikanten Anstieg der Expression von *CILP* auf das  $4,79 (\pm 0,94)$  – fache verglichen mit der Expression in Zellen, die auf einem 12 kPa Hydrogel kultiviert wurden. Auch die Expression von *OPN* stieg durch erhöhte Steifheit signifikant auf das  $2,88 (\pm 0,83)$  -fache an.

Der Transkriptionsfaktor *RUNX2* wurde durch die höhere mechanische Belastung signifikant niedriger exprimiert, die Expression entsprach dem  $0,76 (\pm 0,11)$  – fachen der weniger stark belasteten Fibroblasten.

Keine signifikanten Veränderungen ließen sich für die osteogenen Marker *COMP* und *SPARC* feststellen.



**Abbildung 36: Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von osteogenen Markern nach 48 Stunden Kultivierung auf Hydrogelen verschiedener Porengrößen**

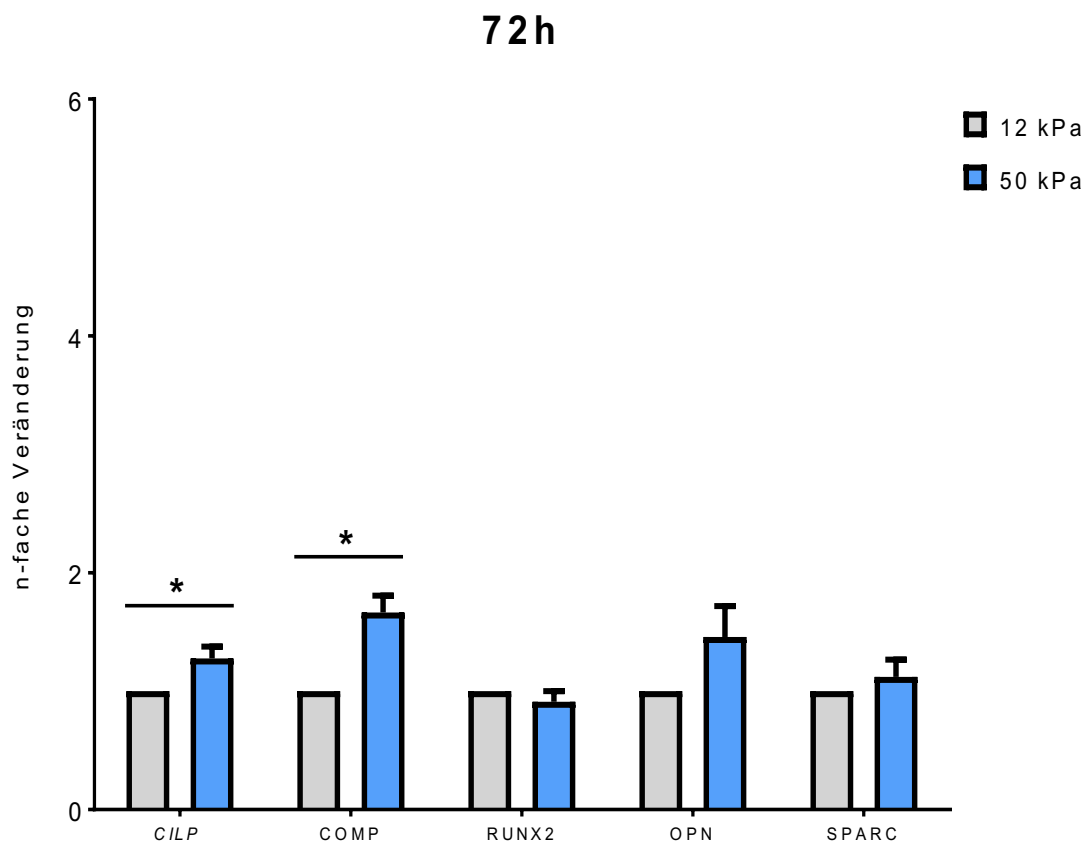
Analysiert wurde die Expression von *CILP*, *COMP*, *RUNX2*, *OPN*, *SPARC* in kardialen Fibroblasten jeweils auf Hydrogelen mit der Porengröße 12 bzw. 50 kPa

Darstellung der n-fachen Veränderung der Expression in kardialen Fibroblasten auf 50 kPa Hydrogelen im Vergleich zu 12 kPa Hydrogelen

Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$ , Statistik mittels ungepaartem t-Test,  $n=9$  (entspricht technischen Replikaten)

Auch nach 48 Stunden waren die Expressionen von *CILP* und *OPN* in den Fibroblasten, die auf Hydrogelen größerer Porengröße kultiviert wurden, signifikant erhöht. Zusätzlich stieg die Expression von *SPARC* durch die mechanische Stimulation auf das  $1,41 (\pm 0,10)$  – fache.

Die Expression von *RUNX2*, die nach 24 Stunden noch einen signifikanten Unterschied zwischen 12 und 50 kPa Hydrogelen aufwies, glich sich nach 48 Stunden wieder an, sodass kein signifikanter Unterschied feststellbar war. Auch die Expression von *COMP* wies zwischen den beiden Bedingungen keinen signifikanten Unterschied auf



**Abbildung 37: Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von osteogenen Markern nach 72 Stunden Kultivierung auf Hydrogelen verschiedener Porengrößen**

Analysiert wurde die Expression von *CILP*, *COMP*, *RUNX2*, *OPN*, *SPARC* in kardialen Fibroblasten jeweils auf Hydrogelen mit der Porengröße 12 bzw. 50 kPa

Darstellung der n-fachen Veränderung der Expression in kardialen Fibroblasten auf 50 kPa Hydrogelen im Vergleich zu 12 kPa Hydrogelen

Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$ , Statistik mittels ungepaartem t-Test,  $n=9$  (entspricht technischen Replikaten)

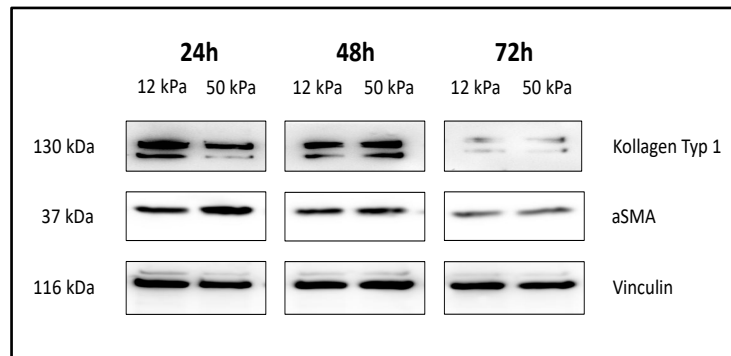
Die Expression von *CILP* war nach 72 Stunden Kultivierung auf 50 kPa Hydrogelen wie zu den beiden früheren Zeitpunkten noch immer signifikant erhöht, allerdings fiel die Steigerung mit einem Anstieg auf das 1,28 ( $\pm 0,10$ ) – fache weniger stark aus.

Der Marker *COMP*, dessen Expression nach 24 und 48 Stunden durch höhere Steifheit keine signifikanten Veränderungen aufwies, wurde nach 72 Stunden signifikant erhöht

exprimiert. In den Fibroblasten, die auf 50 kPa Hydrogelen kultiviert wurden, stieg die Expression auf das  $1,67 (\pm 0,14)$  – fache der Expression in Fibroblasten, die auf 12 kPa Hydrogelen kultiviert wurden.

Für die Expressionen von *RUNX2*, *OPN* und *SPARC* ließen sich keine signifikanten Veränderungen durch erhöhte Steifheit des Untergrundes feststellen.

### 3.3.2.3. Veränderungen der Proteinexpression von Aktivierungsmarkern in kardialen Fibroblasten auf Translationssebene durch Variation der Steifheit des Untergrundes



**Abbildung 38: SDS-Page zur Analyse der Proteinexpression in kardialen Fibroblasten in Abhängigkeit von der Porengröße der Hydrogele, auf denen die Zellen kultiviert wurden**

Isolation der Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden, Vergleich von Zellen, die auf Hydrogelen mit 12 kPa bzw. 50 kPa kultiviert wurden

Analyse der Proteine Kollagen Typ 1,  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin, Vinculin als Referenzgen

Vergleich man die Expression von Kollagen Typ 1 in kardialen Fibroblasten, die auf 12 kPa Hydrogelen kultiviert wurden, zu den verschiedenen Isolierungszeitpunkten untereinander, so war die Expression nach 24 Stunden am höchsten. 48 Stunden nach Beginn des Versuchs, war die Expression niedriger als nach 24 Stunden, nach 72 Stunden war sie nur noch schwach nachweisbar.

In den Fibroblasten, die auf Hydrogelen mit einer 50 kPa Porengröße kultiviert wurden, nahm die Expression von Kollagen Typ 1 nach 48 Stunden im Vergleich zur Expression nach 24 Stunden leicht zu, nach 72 Stunden war sie wie bei den Zellen mit geringerer mechanischer Belastung nur noch schwach nachweisbar.

Betrachtete man die Expression von Kollagen Typ 1 abhängig von der Porengröße der Hydrogele, war sie nach 24 Stunden auf 50 kPa Hydrogelen niedriger, nach 48 Stunden höher als in Fibroblasten, die auf 12 kPa Hydrogelen kultiviert wurden. Nach 72 Stunden war die Expression unter beiden Bedingungen nur noch schwach nachweisbar.

Die Expression von  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin war in den Fibroblasten, die auf Hydrogelen mit 12 kPa Porengröße kultiviert wurden, nach 24 und 48 Stunden Kultivierung ähnlich, nach 72 Stunden nahm sie deutlich ab. In den auf 50 kPa Hydrogelen kultivierten Zellen war die Expression nach 24 Stunden am höchsten, nach 48 Stunden nahm sie leicht ab und sank nach 72 Stunden noch einmal deutlich.

Durch die erhöhte Steifheit des Untergrundes stieg die Expression von  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin nach 24 Stunden in den an, bevor sie sich zu den beiden späteren Zeitpunkten anglich.

## 4. Diskussion

Die PAH ist eine lebensbedrohliche und bis heute unheilbare Erkrankung. Die dominierende Todesursache ist dabei das Rechtsherzversagen. Ein histologischer Schlüsselaspekt des versagenden rechten Ventrikels ist der fibrotische Umbau, der sich negativ auf die Compliance und Funktion des Herzmuskels auswirkt. Um die molekularen Vorgänge, die zur Ausbildung der Fibrose führen, besser verstehen zu können, ist es wichtig, Faktoren zu identifizieren, die zur Aktivierung der im Gewebe residierender Fibroblasten führen. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss mechanischer Stimuli auf die Aktivierung kardialer Fibroblasten zu untersuchen und die Differenzierung dieser Zellen im Kontext zu verstehen. Dazu wurde die Gen- und Proteinexpression charakteristischer Marker zeitabhängig unter verschiedenen Umgebungsbedingungen untersucht.

### 4.1. Molekulare Charakterisierung humaner kardialer Fibroblasten

Fibroblasten sind aufgrund ihrer räumlichen Anordnung im Gewebe und durch ihre unterschiedlichen Funktionen eine heterogene Zellpopulation, was sich sowohl auf Gen- als auch auf Protein- Expressionsebene widerspiegelt. Die in den Versuchen dieser Arbeit verwendeten kardialen Fibroblasten wurden von der Firma Promocell aus humanem Herzgewebe isoliert. Dabei wurden die isolierte Zellpopulation durch den Nachweis von CD90 und das Fehlen von  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin und Slow Muscle Myosin Expression definiert.

Um die Identität der Zellen zu bestätigen und diese heterogene Zellpopulation spezifischer zu charakterisieren, wurden für diese Arbeit Genexpressionsanalysen von unterschiedlichen Markern durchgeführt, um dadurch Rückschlüsse auf die Komposition der kultivierten Zellen ziehen zu können. Da kein einzelner genetischer Marker spezifisch eine Zellpopulation definiert, wurde ein Panel an Markern anhand der bestehenden Literatur ausgewählt und getestet.

CD90, das von der Firma Promocell verwendet wurde, um die kardialen Fibroblasten zu identifizieren, ist ein an der Zelloberfläche lokalisiertes Zelladhäsionsmolekül, das zur Familie der Immunglobuline zählt. Neben Fibroblasten wird es unter anderem von Endothelzellen, Neuronen und Leukozyten exprimiert (Kisselbach et al., 2009; Tarbit et al., 2019).

Die Ergebnisse der qPCR wiesen zudem das Vorhandensein des Strukturproteins Vimentin nach, das Bestandteil des Intermediärfilaments Typ III ist und als solches am Aufbau des Zytoskeletts einer Vielzahl von Zelltypen wie Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen beteiligt ist (Tarbit et al., 2019; Satelli & Li, 2011; Wang & Stamenovic, 2002).

Genexpressionsanalysen auf Einzelzellebene haben das für Decorin codierende Gen als stark exprimiertes Gen in kardialen Fibroblasten identifiziert. Es handelt sich dabei um ein Protein der Extrazellulärmatrix, das eine wichtige Rolle in antifibrotischen und proinflammatorischen Prozessen spielt. *DECORIN* konnte, ebenso wie das Gen des Tyrosinkinaserzeptors *DDR2*, in der isolierten Zellpopulation nachgewiesen werden. *DDR2* ist in Prozesse der Zellproliferation und -migration involviert. Beide sind sowohl in Fibroblasten, als auch in anderen Zelltypen nachweisbar (Leitinger, 2003; Zhang et al., 2013; Ichikawa et al., 2007; Zhang et al., 2018; Gubbiotti et al., 2015). Gleiches gilt für *S100A4*, dessen Funktion noch nicht ausreichend geklärt ist (Tarbit et al., 2019; Boye & Mælandsmo, 2010).

Das nachgewiesene Gen *TCF21* codiert für den gleichnamigen Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle in der Trans-Differenzierung und Migration epithelialer Zellen hin zu myokardialen Fibroblasten spielt (Tarbit et al. 2019).

Obwohl die Zellen durch Promocell  $\alpha$ -SMA negativ sondiert wurden, ließ sich auch dieser Marker in der durchgeführten Analyse nachweisen. Hierbei handelt es sich um ein Aktin, das wichtig für die Zellteilung und -kontraktilität ist. Neben glatten Muskelzellen lässt sich  $\alpha$ SMA in Myofibroblasten nachweisen (Rockey et al., 2013; Shinde et al., 2017; Hinz & Gabbiani, 2003).

Aus der Familie der *Platelet-derived growth factor receptors* konnten mit dem Nachweis der Expression von *PDGFRA* und *PDGFRB*, zwei Mitglieder mittels qPCR in der Zelllinie nachgewiesen werden. Der Tyrosinkinaserzeptor *PDGFRA* ist essentiell für das Überleben von Fibroblasten und wird dauerhaft unabhängig von deren Aktivierungsstadium exprimiert. *PDGFRB* lässt sich ebenfalls im physiologischen Herzgewebe nachweisen, allerdings wird es nicht von Fibroblasten, sondern vor allem von Perizyten exprimiert (Ivey et al., 2019; Asli et al., 2018).

Endomucin wird von Endothelzellen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle in Vorgängen der Angiogenese. Auch hier gelang der Nachweis in der qPCR (Liu et al., 2001). *NG2* wird von Zellen des Nervensystems exprimiert (Trotter et al., 2010).

Die Ergebnisse der durchgeführten qPCR lassen die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei den verwendeten Zellen nicht um eine reine Fibroblastenkultur handelte, sondern ein Gemisch aus verschiedenen Zellpopulationen. Dazu zählen unter anderem Fibroblasten, Endothelzellen, Perizyten und glatte Muskelzellen. Hierfür spricht die starke Expression der ausgewählten Fibroblastenmarker bei gleichzeitigem Nachweis diverser anderer Zellmarker wie *PDGFRB*, *NG2* oder *EMC*, die nicht spezifisch für Fibroblasten sind. Eine weitere Erklärungsansatz für den Nachweis nicht-fibroblastenspezifischer Zellmarker ist, dass Fibroblasten in Kultur möglicherweise ein zum Teil endotheliales Genexpressionsprofil akquirieren oder durch Ereignisse wie Trans-Differenzierung die mesenchymale Linie verlassen. Dies spiegelt die Heterogenität von Fibroblastenpopulationen wider. Der Nachweis von *ACTA2* gibt Hinweise auf eine teils spontane, teils vom Untergrund, auf dem die Zellen kultiviert werden, abhängige Aktivierung der Fibroblasten. Diese Annahmen trägt zu einer besseren Interpretation der nachfolgenden Ergebnisse bei.

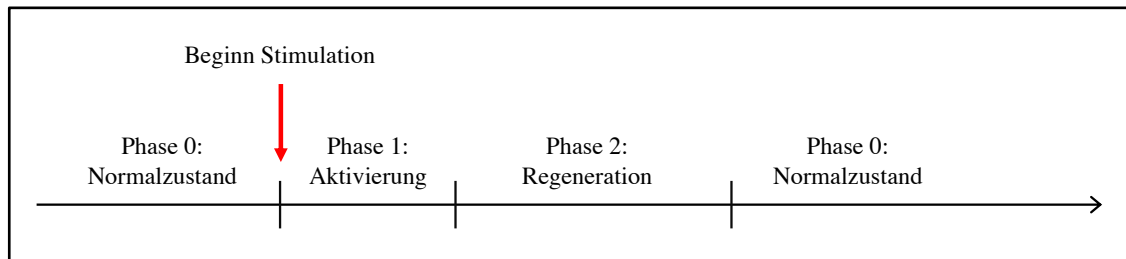
#### **4.2. Charakterisierung der kardialen Fibroblasten mittels Immunfluoreszenzfärbung**

Um die verwendeten Zellen weitergehend charakterisieren zu können, wurden sie unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung betrachtet. Dabei konnte das Strukturprotein Vimentin in allen kultivierten Zellen nachgewiesen werden. Zudem demonstrierten morphologische Untersuchungen ein längliches, spindelförmiges Aussehen der Zellen, was für ein dominantes Vorliegen von Fibroblasten spricht und damit die Genexpressionsanalysen bestätigt. Das Vorhandensein von  $\alpha$ SMA in Form von Stressfasern in vereinzelt Zellen weist darauf hin, dass eine geringe Anzahl von Fibroblasten bereits vor Stimulationsbeginn zu Myofibroblasten aktiviert wurde. Einen möglichen Faktor für die Aktivierung der Zellen stellt die Oberfläche der Zellkulturflasche dar, in der die Zellen expandiert wurden. Das Plastik weist eine sehr viel höhere Steifheit wie Herzgewebe auf (Herum et al., 2017).

#### **4.3. Mechanische Stimulation**

In dieser Arbeit wurden kardiale Fibroblasten mittels verschiedener mechanischer Kräfte stimuliert. Aufgrund vorheriger Studien (MacKenna et al., 1998; Atance et al., 2004). und

den Ergebnissen dieser Arbeit konnte ein Schema erstellt werden, das die zeitlichen Abläufe der Aktivierung von Fibroblasten darstellt und mit Hilfe dessen die erlangten Ergebnisse eingeordnet werden können. Dabei verläuft die Aktivierung *in vivo* in verschiedenen Phasen, die sich in ihrer Dauer unterscheiden, jedoch immer nach dem gleichen Muster ablaufen.



**Abbildung 39: Schematische Darstellung der Aktivierung von kardialen Fibroblasten durch mechanische Stimulation**

Vor Beginn des Stimulus befinden sich die Fibroblasten in einem Normalzustand, die Synthese von EZM-Bestandteilen sowie die Degradierung tragen zur Homöostase der EZM bei. Eine geringe Zahl der Fibroblasten ist bereits vor Beginn der Stimulation aktiviert, wie durch Immunfluoreszenzfärbung und *ACTA2*-Genexpression im unstimulierten Zustand beobachtet werden konnte.

Folgt ein mechanischer Stimulus, treten die Fibroblasten in die Phase der Aktivierung ein. Diese wird gekennzeichnet durch einen Anstieg der Expression von Aktivierungsmarkern, darunter  $\alpha$ SMA, Bestandteilen der EZM und weiteren Proteine.

*ACTA2* codiert für  $\alpha$ SMA, das sowohl in glatten Muskelzellen als auch aktivierten Fibroblasten vorkommt. Es bildet Stressfasern, die kontraktile Eigenschaften besitzen. Zusammen mit weiteren Markern kann es zur Identifizierung von Myofibroblasten verwendet werden (Rockey et al., 2013; Hinz & Gabbiani, 2003). Auch das Fibroblast activated protein  $\alpha$  dient als ein Marker für die Aktivierung von Fibroblasten. Es handelt sich um eine membrangebundene Serinprotease, die an Zellmigration und Matrixdegradierung beteiligt ist (Tillmanns et al., 2015; Archarya et al., 2006). *CKAP4* codiert für ein transmembranöses Protein, das als Rezeptor für verschiedene Liganden dient. In aktivierten Fibroblasten konnte es in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen werden, die exakte Funktion im Herzen, insbesondere in Fibroblasten, ist noch nicht genau verstanden (Gladka et al. 2018).

Bei SNAI1 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor mit der Struktur eines Zinkfingers. Unter normalen Umständen wirkt er als transkriptionaler Repressor. Durch profibrotische Cytokine wird SNAI1 zum Aktivator der Transkription in kardialen Fibroblasten, um die Synthese und die Querverknüpfung von Kollagen zu steigern und die Expression weiterer profibrotischer Gene zu erhöhen. Diese Einflüsse lassen annehmen, dass SNAI1 zum Phänotyp von Myofibroblasten beiträgt (Biswas & Longmore 2016).

Zu den Bestandteilen der EZM, die bei einer Aktivierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten stärker produziert wird, zählt das Strukturprotein Kollagen Typ 1, das den Hauptbestandteil der EZM des Herzgewebes bildet (Nimni, 1983).

Neben strukturgebenden Proteinen werden durch Myofibroblasten zudem matrizelluläre Proteine in höheren Konzentrationen exprimiert. Eines dieser matrizellulären Proteine ist POSTN, das mit anderen Bestandteilen der EZM interagiert und zur Zellregulation beiträgt. Hierunter fällt beispielsweise die Aktivierung der LOX, einer kupferabhängigen Aminoxydase, die zur Querverknüpfung von Kollagenfibrillen beiträgt und daher ebenfalls verstärkt von Myofibroblasten exprimiert wird (Snider et al., 2009; Frangogiannis, 2012; Oka et al., 2007; Landry et al., 2018; Shimazaki et al., 2008; Schellings et al., 2004; López et al., 2010).

Nach der Aktivierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten mit einem Anstieg der Expression von Aktivierungsmarkern, kehren diese wieder in das Stadium vor der Aktivierung zurück. Dieser Vorgang verläuft über eine Regenerationsphase, in der die Expression von Aktivierungsmarkern unterhalb des Niveaus in Fibroblasten im Normalzustand sinkt. Im Anschluss nähert sich die Expression wieder dem Level des Ausgangszustandes an.

Fu und Kollegen konnten in ihrer Studie von 2018 noch ein weiteres Stadium ausmachen, in das die Fibroblasten nach Aktivierung eintraten. Myofibroblasten de-differenzierten nach einem ischämischen Infarkt des Herzgewebes nicht wieder zu inaktivierten Fibroblasten, sondern bildeten sogenannte Matrifibroblasten. Hierbei handelt es sich um eine spezialisierte Art von Fibroblasten, die an die Umgebung angepasst ist.

Das Vorliegen von Matrifibroblasten wurde durch die Expression von osteogenen Markern definiert (Fu et al., 2018). CILP ist ein Protein, das TGF- $\beta$  bindet und somit dessen Signalweg hemmt, der normalerweise zur Aktivierung von Fibroblasten und somit zur vermehrten Kollagensynthese führt. Durch die Hemmung dieser Signalkaskade, trägt

CILP zur Homöostase von Fibroblastenaktivierung bei und steuert einer überschießenden Kollagensynthese entgegen (Shindo et al., 2017; van Nieuwenhoven et al., 2017). Im Gegensatz zu CILP, das die Kollagensynthese negativ beeinflusst, erleichtert COMP die Fibrillogenese, indem es die Kollagenfibrillen räumlich annähert und so zur räumlichen Organisation beiträgt (Posey et al., 2018; Vuga et al., 2013; Farina et al., 2006). Auch SPARC trägt zur Entwicklung von Querverknüpfungen zwischen den einzelnen Kollagenfibrillen bei, außerdem ist es an der Prozessierung von Prokollagen beteiligt. Über die Regulation von Wachstumsfaktoren ist es an Vorgängen der Fibrose beteiligt (Frangogiannis 2012; Okamoto et al., 2012). OPN hat Einfluss auf die Fibrillogenese über Veränderungen der Expression von Proteoglykanen, die wiederum zur Fibrillogenese beitragen und über Wachstumsfaktoren, die sich positiv auf die Entstehung von fibrotischem Gewebe auswirken. Außerdem hemmt es die Apoptose von Zellen über die Inhibierung von NF- $\kappa$ B (Frangogiannis, 2012; Schellings et al., 2004; Okamoto et al., 2012).

RUNX2 ist ein Transkriptionsfaktor, der essentiell ist für die Entwicklung des Skeletts ist, indem es die Proliferation von Chondrozyten und die osteogene Differenzierung von Osteoblasten reguliert (Kim et al., 2002).

#### **4.3.1. Mechanische Stimulation durch Dehnung**

Ein mechanischer Stimulus, dem kardiale Fibroblasten in dieser Studie ausgesetzt wurden, war die equibiaxiale Dehnung der Zellen auf Silikonelastomer-matrices mittels Unter- und Überdruckgeneration. Die Silikonelastomer-matrices waren mit Kollagen bzw. Laminin, unterschiedlichen EZM-Komponenten, beschichtet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit in Zusammenschau mit den Ergebnissen früherer Studien deuten darauf hin, dass der Verlauf der Aktivierung von kardialen Fibroblasten durch den mechanischen Stimulus der Dehnung in das oben beschriebene Schema eingeordnet werden kann.

Betrachtet man die Ergebnisse früherer in vitro Studien lässt sich davon ausgehen, dass kardialen Fibroblasten durch Dehnung schon nach kurzer Zeit aktiviert werden. Eine Aktivierung konnte in diesen Studien bereits 5-10 Minuten nach Beginn der Stimulation beobachtet werden und wurde durch eine Steigerung der Expression und Aktivierung von Signalmolekülen, EZM-Bestandteilen etc. definiert (MacKenna et al., 1998; MacKenna et al., 2000). Da für diese Arbeit die erste Analyse der Expression von

Aktivierungsmarkern erst nach 4 Stunden vorgenommen wurde, konnte die Aktivierung zu einem früheren Zeitpunkt nicht dargestellt werden. Es ist allerdings aufgrund der vorherigen Studien davon auszugehen, dass eine Aktivierung mit einer Steigerung der Expression auch in diesem Versuch vor dem gewählten Analysezeitraum stattfand. Zum ersten Isolierungszeitpunkt konnte somit bereits die Phase der Regeneration der Fibroblasten beobachtet werden, in der die Expression der Proteine im Vergleich mit der Expression in nicht gedehnten Zellen reduziert ist. Dieser Rückgang lässt sich durch die Gewöhnung der Zellen an den Stimulus erklären, bei der sich Bestandteile des Zytoskeletts und Stressfasern in den Zellen reorganisieren und sich in Richtung des Stimulus anordnen, um die einwirkenden Kräfte zu relativieren. Dies beobachteten Yeung und Kollegen bereits in ihrer Studie (Yeung et al. 2005). Zudem ist anzunehmen, dass es durch verstärkte Expression der Marker zu einer negativen Rückkopplung kommt. Nach der Regenerationsphase gehen die Zellen in einen Status über, der dem des Normalzustandes und damit dem des Ausgangsstadiums entsprach. Diese Beobachtung kann unter Betrachtung der physiologischen Bedingungen erklärt werden. Das humane Herz schlägt im gesunden Zustand mit einer Frequenz von 60-120 Schlägen die Minute. Dabei kommt es durch das einströmende Blut zur Dehnung der Herzwände, wodurch die am Aufbau beteiligten Zellen gedehnt werden. Würden sich die kardialen Fibroblasten nicht an den mechanischen Stimulus adaptieren und diesen tolerieren, so wäre in vitro jeder Herzschlag ein mechanischer Stimulus und kardiale Fibroblasten wären dauerhaft aktiviert, sodass auch unter physiologischen Bedingungen fibrotische Prozesse stattfinden würden.

Neben dem mechanischen Stimulus wurde für diese Arbeit auch der Einfluss der unterschiedlichen Beschichtung des Untergrundes, auf dem die kardialen Fibroblasten gedehnt wurden, untersucht. Unabhängig von der Beschichtung können die Ergebnisse grundsätzlich in den oben aufgezeigten schematischen Verlauf eingeordnet werden. Dabei wurden jedoch Unterschiede in der Genexpression der einzelnen Aktivierungsmarker, sowie zwischen den interagierenden EZM-Bestandteilen deutlich. So waren nach 4 Stunden Stimulation die Marker *LOX* und *SNAIL* in den auf kollagenbeschichteten Matrices gedehnten Zellen stark erhöht, während die anderen Marker niedriger oder unverändert exprimiert wurden. Diese Diskrepanz zwischen den einzelnen Aktivierungsmarkern ließ sich auch bei der Beschichtung mit Laminin beobachten, hier allerdings erst nach 48 Stunden Stimulation. Die zeitlichen Abweichungen der Expressionsveränderungen lässt sich unter anderem durch die

gegenseitige Beeinflussung der Marker untereinander erklären. So aktivieren die EZM-Bestandteile POSTN und COL1A1 die Expression von LOX, das wiederum zur Verknüpfung von Kollagenfibrillen benötigt wird. Es liegt nahe, dass die Expression von LOX nicht direkt durch Dehnung aktiviert wird, sondern durch den Anstieg von POSTN und COL1A1. Der Transkriptionsfaktor SNAI1, der unter normalen Bedingungen als Repressor fungiert, ändert durch profibrotische Faktoren seine Funktion und wirkt als Aktivator der Transkription.

Unter diesem Gesichtspunkt wird deutlich, dass es sich bei der Aktivierung von Fibroblasten nicht um einen abrupten, zeitlich immer gleich ablaufenden Vorgang handelt, sondern dass durch die Beeinflussung von Faktoren untereinander ein fließender Übergang zwischen den Phasen entsteht und es auch innerhalb der Phase unterschiedliche Verläufe gibt. Diese unterscheiden sich hinsichtlich des Verlaufs der Genexpression von Aktivierungsmarkern sowie in der Dauer. Deutlich wird dies zum Beispiel bei der Betrachtung unterschiedlicher Beschichtungen des Untergrundes, auf dem die Zellen gedehnt werden. Abhängig von der Beschichtung mit Kollagen oder Laminin, beides Bestandteile der EZM, zeigten sich Unterschiede in der Dynamik der Genexpression zu den verschiedenen Isolationszeitpunkten. Auch für die Dauer der Regenerationsphase ließ sich durch diese Arbeit ein Einfluss der Beschichtung vermuten. Während die Zellen, die auf kollagenbeschichteten Membranen gedehnt wurden, nach 48 Stunden wieder im Normalzustand befanden, hielt die Regenerationsphase bei Laminin länger an (Hsu et al., 2010; Wang et al., 2001).

Um den Einfluss der Beschichtung auf den Verlauf erklären zu können, müssen verschiedene Faktoren berücksichtigt werden. Frühere Studien zeigten, dass Zellen, die mit Laminin interagierten, auch ohne weiteren Stimulus aktiviert wurden und vermehrt JNK exprimierten, während durch alleinige Interaktion mit Kollagen weder der Signalweg über JNK noch ERK aktiviert wurde. Des Weiteren bestehen verschiedene Mechanismen zur Registrierung von mechanischen Reizen. Unabhängig der EZM und damit der Beschichtung, wird mechanische Dehnung direkt durch Bestandteile des Zytoskeletts wahrgenommen. Diese werden durch die Dehnung der Zelle mitgedehnt, wodurch angelagerte Signalmoleküle aktiviert werden. Neben dieser direkten Wahrnehmung wird außerdem eine Aktivierung von mechanosensitiven Calciumkanälen diskutiert, auch diese Alternative scheint unabhängig von der EZM.

Abhängig von der EZM ist die Registrierung von mechanischen Stimuli über Integrine. Diese sind in der Zellmembran positioniert und führen bei Aufnahme eines mechanischen

Reizes zu einer Aktivierung verschiedener Abwärts-Signalkaskaden. Ein Ansatz ist die Signalkaskade über die nicht-rezeptorgebundene Tyrosinkinase FAK, dass sich luminal an Integrine anlagert und bei einer Aktivierung dieser phosphoryliert wird. Dies führt zur Aktivierung weiterer Signalmoleküle, was sich schlussendlich auf Genexpression, Zellmotilität und Zellproliferation auswirkt (Hsu et al., 2010; Wang et al., 2001).

MacKenna und Kollegen führten die Unterschiede zwischen den EZM-Bestandteilen auf die Auswirkungen der Aktivierung von Fibroblasten auf die spezifische Interaktion der EZM-Bestandteile mit Integrinen zurück (MacKenna et al., 1998). So sind je nach EZM-Bestandteil unterschiedlich starke Stimuli notwendig, um eine Aktivierung der Fibroblasten zu erreichen. Während bei Laminin schon die reine Interaktion ohne mechanischen Stimulus zur teilweisen Aktivierung der Zellen genügt, ist dies bei Kollagen nicht der Fall. Wird ein mechanischer Stimulus über Integrine weitergeleitet, kam es zur Aktivierung von unterschiedlichen Signalwegen, wodurch Unterschiede in der Art und Geschwindigkeit der Zellantwort erklärt wurden.

Die Unterschiede je nach EZM-Bestandteil sind im physiologischen Rahmen als sinnvoll zu betrachten, da Kollagen 1 als Hauptbestandteil der EZM überwiegend an der Übertragung von mechanischen Kräften auf Zellen beteiligt ist. Wäre die Sensitivität für die Aktivierung durch Dehnung von Kollagen vermittelt über Integrine sehr hoch, so jeder Herzschlag einen ausreichenden Stimulus darstellen und kardiale Fibroblasten wären dauerhaft aktiviert. Für Laminin hingegen wird angenommen, dass es mechanische Kräfte vorwiegend in pathologischen Situationen auf die Zellen überträgt, was eine schnellere Aktivierung sinnvoll erscheinen lässt.

Unabhängig von den Unterschieden der EZM-Bestandteile, kann durch diese Studie ERK als der Hauptsignalweg für langfristige Veränderungen identifiziert werden. Für JNK, p-65, SMAD 2/3 und p38 konnte keine Veränderungen in der Stärke der Aktivierung durch mechanische Dehnung festgestellt werden. Frühere Studien zeigen, dass diese Signalwege in den sofortigen Zellantworten eine wichtige Rolle spielen, allerdings finden diese schon 5-10 Minuten nach Beginn der Dehnung statt und wurde in diesem Versuchsaufbau nicht analysiert (MacKenna, et al., 2000). Auch die über NF- $\kappa$ B vermittelten Signalkaskaden kann in den langfristigen Beobachtungen nicht als signifikant beteiligt ermittelt werden.

Betrachtete man den Einfluss von mechanischer Dehnung auf das Expressionsmuster von osteogenen Markern, gestaltete sich deren Verlauf ähnlich dem der Aktivierungsmarker. Auch hier konnten Unterschiede zwischen den EZM-Bestandteilen nachgewiesen werden, grundsätzlich können jedoch auch diese Verläufe in das Aktivierungsschema für die Fibroblasten eingeordnet werden. Die Zellen, die auf Kollagen ausgesät wurden, zeigten nach 4 Stunden noch verstärkte Expressionen der Marker *CILP* und *SPARC*, in den Zellen, die auf Laminin ausgesät wurden befanden sich die Expressionen im Rückgang, außer *RUNX2*, welches erhöht war. 24 Stunden nach Beginn der Stimulation befanden sich die Zellen in der Phase der Regeneration, bevor sie nach 48 Stunden wieder den Normalzustand erreicht hatten. Während die auf Kollagen gedehnten Zellen *OPN* exprimierten, war dieses in den Zellen, die auf Laminin gedehnt wurden nicht nachweisbar. Da die Expression der osteogenen Marker kurzzeitig anstieg, lässt sich annehmen, dass die Zellen kurzzeitig zu Matrifibroblasten differenzierten, bevor sie anschließend wieder in den Normalzustand zurückkehrten. Es ist davon auszugehen, dass der Weg der Aktivierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten bzw. Matrifibroblasten grundsätzlich umkehrbar ist, auch, wenn der Stimulus weiterhin aufrechterhalten wird.

Damit sind die Ergebnisse von Fu und Kollegen über den Differenzierungsstatus von Fibroblasten nicht vollständig auf die durchgeführte Studie zu übertragen (Fu et al., 2018). Während sich die Fibroblasten im Versuchsaufbau von Fu und Kollegen nach einem ischämischen Infarkt schließlich zu Matrifibroblasten differenzieren, die osteogene Marker produzieren und im Narbengewebe verbleiben, gehen durch Dehnung stimulierte Fibroblasten wieder in den Status von inaktivierten Fibroblasten über. Diese Diskrepanz kann durch die unterschiedlichen Bedingungen erklärt werden, denen die Fibroblasten *in vivo* bzw. *in vitro* unterliegen. Der komplexe Aufbau und die Veränderungen der Struktur des Herzmuskels können im *in vitro* Modell nicht abgebildet werden.

Während es sich bei einem Myokardinfarkt um ein Einzelevent mit anschließenden reaktiven Vorgängen im Organismus handelt, stellt die equibiaxiale Dehnung einen kontinuierlichen und sich wiederholenden Reiz dar, der sich im zeitlichen Verlauf nicht verändert.

Ein weiterer Unterschied ist die Entstehung einer Narbe in der Herzwand durch die Unterversorgung des Herzmuskels bei einem Myokardinfarkt. Dabei gewährleisten unter anderem Matrifibroblasten die Stabilität der Narbe. Diese Funktion kommt den Fibroblasten im Versuchsaufbau in Kulturgefäßen nicht zu.

Es ist außerdem zu beachten, dass in vivo durch den Herzschlag vorrangig die gesamte Herzwand gedehnt wird, inwieweit dieser Stimulus auf die Fibroblasten übertragen wird, ist nach derzeitiger Studienlage nicht vollständig geklärt. Dadurch lässt sich nicht bestimmt sagen, ob die Zellen nach dem Myokardinfarkt einer kontinuierlichen Stimulation ausgesetzt sind oder ob die mechanischen Kräfte einen gewissen Schwellenwert übersteigen müssen, damit diese auf die Fibroblasten übertragen werden und zu deren Aktivierung führen. In vitro wird dagegen sichergestellt, dass die mechanische Dehnung direkt und kontinuierlich auf die Fibroblasten übertragen wird.

Die Annahme, dass die Differenzierung von Fibroblasten in Myo- und Matrifibroblasten grundsätzlich umkehrbar ist, stimmt mit Beobachtungen an Patienten mit chronisch thromboembolischer PH überein. Diese Patienten entwickeln einen stark erhöhten pulmonal-vaskulären Widerstand durch die Formation eines Lungenthrombus mit anschließender Beeinträchtigung des rechten Ventrikels, inklusive einer Hypertrophie der Wand und einer Dilatation als Zeichen erhöhter Wandspannung und Dehnung. In diesen Patienten wurde beobachtet, dass sich infolge einer chirurgischen Entfernung des Thrombus durch PEA und der damit verbundenen Normalisierung der Nachlast des rechten Ventrikels, die Hypertrophie und Dilatation zurückbilden ohne Anzeichen einer entarteten Fibrose. Dies suggeriert, dass die Fibroblastenaktivierung zum einen umkehrbar ist und zum anderen, dass molekulare Kontrollmechanismen existieren, die die unmittelbare Umgebung wahrnehmen, um auf Änderungen akut zu reagieren (Mullin & Klinger, 2018; Reesink et al., 2007).

#### **4.3.2. Mechanische Stimulation durch Steifheit des Untergrundes**

Neben der mechanischen Stimulation durch Dehnung wurden kardiale Fibroblasten für diese Arbeit auf Hydrogelen unterschiedlicher Porengröße und damit unterschiedlicher Steifheit kultiviert. Während 12 kPa Porengröße der Steifheit gesunden Herzgewebes entsprach, wurden Hydrogele mit 50 kPa Porengröße verwendet, um die Steifheit fibrotischen Herzgewebes zu simulieren. Auch bei diesem Versuchsaufbau ist davon auszugehen, dass die Aktivierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten durch Steifheit des Untergrundes vor dem ersten Isolationszeitpunkt liegt, allerdings später als bei der Stimulation durch Dehnung. Dies ist dadurch bedingt, dass die Zellen sich erst an die Hydrogele und ihre Kollagenbeschichtung anlagern müssen. Nach 24 Stunden schienen

sich die Fibroblasten, die einer höheren mechanischen Belastung ausgesetzt waren zwischen der Phase der Aktivierung und der Phase der Regeneration zu befinden. Die Expression von *CKAP4* und *LTBP2* war zu diesem Zeitpunkt bereits reduziert, die anderen Marker zeigten eine Tendenz in Richtung Reduzierung, was nach 48 Stunden deutlich wurde. Nach 72 Stunden kehrten die wurden einige Marker schon wieder wie im Ausgangszustand exprimiert, andere wiesen noch eine Diskrepanz auf, was vermuten lässt, dass sich die Zellen im Übergang zwischen Erholung und Normalzustand befanden. Proteinexpressionsanalysen der Zellen zeigten darüber hinaus auch eine Aktivierung der Zellen, die auf einem 12 kPa Gel kultiviert wurden. Dies kann durch interzelluläre Verbindungen erklärt werden, die schon bei geringen mechanischen Kräften gebildet werden.

Die Expression von osteogenen Markern war nach 24 und 48 Stunden teilweise erhöht, nach 72 Stunden näherte sie sich wieder dem Normalzustand. Damit ist der Verlauf ähnlich wie in den durch mechanische Dehnung stimulierten Fibroblasten, allerdings zeitlich nach hinten verschoben, was auf den Prozess der Anlagerung an die Hydrogele zurückzuführen ist. Der Verlauf deutet darauf hin, dass die Fibroblasten zwischenzeitlich zu Matrifibroblasten differenzieren, jedoch nicht in diesem Zustand residieren, sondern in den Normalzustand zurückkehren.

Betrachtete man die Morphologie der Zellen, so unterschied sich diese abhängig von der Porengröße des Gels, auf dem sie kultiviert wurden. Auch die Adhäsion der Zellen an dem Gel unterschied sich je nach Porengröße des Untergrundes - je größer die Porengröße, desto stärker die Adhäsion am Untergrund. Diese Beobachtung konnten schon von Yeung und Kollegen machen, sie erklärten diese mit einer gesteigerten Expression von  $\alpha 5$ -Integrinen, die eine Anlagerung der Zellen an Bestandteile der EZM vermittelten (Herum et al., 2017; Yeung et al. 2005).

## 5. Zusammenfassung

Die pulmonal-arterielle Hypertonie ist charakterisiert durch eine progressive Vaskulopathie pulmonaler Arterien und Arteriolen, die derzeit therapierbar, aber nicht heilbar ist. Die Symptomatik ist unter anderem stark durch eine funktionelle Beeinträchtigung des rechten Ventrikels gekennzeichnet. Pathologische Veränderungen in der Gefäßwand der Lungenstrombahn tragen zu einer chronischen Verengung des Gefäßdurchmessers bei, was wiederum die Nachlast des RV chronisch erhöht. Der RV ist initial in der Lage, diese Erhöhung der Nachlast zu kompensieren, jedoch kommt es im zeitlichen Verlauf zu Veränderungen in der Struktur des RV, die dazu führen, dass dessen Leistung abnimmt. Der erhöhte Widerstand kann dadurch nicht mehr kompensiert werden, was schließlich zum Versagen des RV führt, was häufig letal endet. Dieses finale Stadium ist histopathologisch durch fibrotische Areale im RV gekennzeichnet. Die Fibrose entsteht auf zellulärer Ebene infolge einer Aktivierung von im Gewebe residierender kardialer Fibroblasten, die anschließend vermehrt EZM-Moleküle produzieren, in die Umgebung sezernieren und damit strukturelle Integrität und ein heterogenes Umfeld erzeugen.

In dieser Dissertation wurde der Einfluss mechanischer Kräfte auf die Aktivierung humaner kardialer Fibroblasten untersucht. Dazu wurden Studien nach equibiaxialer Dehnung und erhöhter Untergrundsteife durchgeführt und Gen- sowie Proteinexpressionsprofile erstellt. Auf Basis der ermittelten Daten wurde ein Modell erstellt, welches den zeitlichen Verlauf der Fibroblastenaktivierung beschreibt. In diesem Modell gingen Fibroblasten nach Stimulation in einen Aktivierungszustand über, in welchem sie als Myofibroblasten vermehrt  $\alpha$ SMA (Acta2) und EZM-Bestandteile exprimierten. Diese Phase wurde durch einen Zustand der Regeneration abgelöst, in dem sich die Gen- und Proteinexpression der Fibroblasten schrittweise der Expression des Ausgangszustandes annäherten. Die Expression osteogener Marker folgte dem Verlauf der Aktivierung mit einer Rückkehr zum Ausgangszustand bei aufrechterhaltener Stimulation über die Zeit.

Des Weiteren konnten in dieser Studie Unterschiede in der molekularen Verarbeitung mechanischer Signale in Abhängigkeit von der Interaktion mit umgebenden EZM-Bestandteilen detektiert werden, was auf die Interaktion mit Integrinen zurückgeführt wurde.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass kardiale Fibroblasten durch mechanische Stimuli stereotyp profibrotisch aktiviert werden und diesen Stimulus im zeitlichen Verlauf durch biochemische Anpassung kompensieren.

## 6. Summary

Pulmonary arterial Hypertension (PAH) is a devastating disease characterized by a progressive occlusive pulmonary vasculopathy of small pulmonary arterioles that causes a persistent increase in right ventricle (RV) afterload, RV failure and ultimately death. The RV adapts to the increased afterload, yet, over time, these adaptive processes transition towards a maladaptive state that contributes to functional RV decline. Dilatation of the RV and increased free wall tension are hallmarks of the remodeled RV and are frequently diagnosed in end-stage patients with excessive RV fibrosis in interstitial and perivascular regions. Fibrosis develops upon activation of tissue resident cardiac fibroblasts that transition towards a pro-migratory, pro-proliferative, pro-contractile myofibroblast phenotype. This phenotype is characterized on a molecular level by excessive ECM-production and formation of contractile  $\alpha$ SMA stress fibers.

This research focused on the relationship between defined mechanical force and fibroblast activation. Therefore, human cardiac fibroblasts were subjected to either equibiaxial strain or increased surface stiffness in a time-dependent manner and gene as well as protein expression analyses were performed.

The data in this study purpose a stereotypic scheme that fibroblasts act upon stimulation with mechanical force. Once stimulated, tissue resident fibroblasts transition towards an activated pro-fibrotic myofibroblast phenotype, characterized by an increased  $\alpha$ SMA production and secretion of ECM-components, followed by expression of genes associated with tissue stiffening, such as osteogenic and cartilage markers with a subsequent recovery of the gene expression pattern towards control levels. This stereotypic cell behavior was observed with different temporal kinetics when stimulating with different types of mechanical force (stretch and stiffness) under defined environmental conditions (collagen and laminin coating). In summary, cardiac fibroblasts adapt to maintained mechanical stimulation in a stereotypic manner by transition towards a pro-fibrotic myofibroblast phenotype, followed by a period of increased osteogenic/cartilage-associated ECM stabilizing genes and return back to controlled gene expression patterns, even when mechanical stimulation is maintained. These findings suggest that mechanical stimulation of cardiac fibroblasts *in vitro* recapitulates key events of *in vivo* transdifferentiation and provide a tool for more detailed molecular studies on cardiac fibroblast activation.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

bzw.	beziehungsweise
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
Aa.	Arteriae
g	Gramm
AV	Atrioventrikular
Vv.	Venae
PH	Pulmonale Hypertonie
mPAP	mittlerer Pulmonalarteriendruck
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
IPAH	Ideopathische pulmonal-arterielle Hypertonie
HPAH	Hereditäre pulmonal-arterielle Hypertonie
PAAH	Pulmonal-arterielle Hypertonie assoziiert mit
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
PPHN	Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen
SAS	Schlafbezogene Atmungsstörungen
CTEPH	Chronisch-thromboembolische pulmonale Hypertonie
WU	Woods Unit
Ipc-PAH	Isolierte präkapilläre pulmonal-arterielle Hypertonie
Cpc-PAH	Kombinierte prä- und postkapilläre pulmonal-arterielle Hypertonie
ETRA	Endothelin-Rezeptor A
ETRB	Endothelin-Rezeptor B
sGc	Lösliche Guanylatzyklase
c-GMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat

NO	Stickstoffmonoxid
cAMP	Zyklisches Adeninmonophosphat
EZM	Extrazellulärmatrix
h	Stunden
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
kPa	Kilopascal
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
BCA	Bicinchoninic acid assay
HRP	Meerrettichperoxidase
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween20
NaCl	Natriumchlorid
diH <sub>2</sub> O	Deionisiertes Wasser
L	Liter
mM	Millimol
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
M	Mol
PCR	Polymerasekettenreaktion
FCS	Fötales Kälberserum
bFGF	Basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
°C	Grad Celcius
RPM	Rotationen pro Minute
Min	Minuten
Hz	Hertz
kPa	Kilopascal
BSA	Rinderalbuminserum
Cy3	Cyaninfarbstoff
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
RNA	Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm

qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
CT	Threshhold Cycle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>B2M</i>	Beta-Mikrotubulin 2
GOI	Gene of Interest
<i>ACTA2</i>	Actin Alpha 2
<i>RUNX2</i>	RunX Family Transcription Factor 2
<i>COL1A1</i>	Kollagen Typ1, alpha 1
<i>LTBP2</i>	latent transforming growth factor beta binding protein 2
<i>FAPA</i>	Fibroblasten aktivierendes Protein alpha
<i>CKAP4</i>	Cytoskeleton-associated protein 4
<i>PDGFRA</i>	Platelet derived growth factor receptor a
<i>CILP</i>	Cartilage Intermediate Layer Protein 1
<i>COMP</i>	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
<i>OPN</i>	Osteopontin
<i>SPARC</i>	Secreted Protein Acidic and Cysteine Rich
<i>SNAIL</i>	Snail Family transcriptional repressor 1
<i>LOX</i>	Lipooxygenase
<i>DDR2</i>	Discoidin Domain Receptor Tyrosinkinase 2
<i>S100A4</i>	S100 calciumbindendes Protein A4
<i>TCF21</i>	Transcription factor 2
<i>EMC</i>	Endomucin
<i>PDGFRB</i>	Platelet derived growth factor receptor b
<i>NG2</i>	Wasserstoffperoxid
nm	Nanometer
µg	Mikrogramm
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff/Salzsäure

V	Volt
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
α-SMA	Alpha Smooth Muscle Actin
COL1	Kollagen Typ 1
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
Tak1	Mitogen-aktivierte Proteinkinasekinase 7
SAPK/JNK	Stressaktivierte Proteinkinase/C-Jun_N-terminale Kinase
pSAPK/pJNK	Phosphorylierte stressaktivierte Proteinkinase/C-Jun_N-terminale Kinase
pERK	Phosphorylierte extracellular-signal regulated Kinase
MAPK	Mitogen activated Protein Kinase
NF-κB	kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
IgG	Immunglobulin G
ANOVA	Analysis of Variance
SEM	Standardfehler
WHO-FC	World Health Organisation-Funktionsklassen

## 8. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1** Vaskuläres Remodeling bei pulmonaler Hypertension (Schermuly et al., 2011)
- Abbildung 2** Mikroskopische Darstellung kardialer Fibroblasten in Zellkultur
- Abbildung 3** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Stimulation mittels biaxialer Dehnung
- Abbildung 4** Programmierte Einstellung des Gerätes zur mechanischen Stimulation mittels bi-axialer Dehnung
- Abbildung 5** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Stimulation mittels variabler Untergrundsteifheit
- Abbildung 6** Beispielhafte grafische Darstellung der Auswertung einer qPCR
- Abbildung 7** Mikroskopische Aufnahme der verwendeten Zellen vor Stimulation mittels Immunfluoreszenzfärbung
- Abbildung 8** Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern nach 4 Stunden bi-axialer Dehnung auf einer kollagenbeschichteten Membran
- Abbildung 9** Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern nach 24 Stunden bi-axialer Dehnung auf einer kollagenbeschichteten Membran
- Abbildung 10** Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern nach 48 Stunden bi-axialer Dehnung auf einer kollagenbeschichteten Membran
- Abbildung 11** Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern nach 4 Stunden bi-axialer Dehnung auf einer lamininbeschichteten Membran
- Abbildung 12** Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern nach 24 Stunden bi-axialer Dehnung auf einer lamininbeschichteten Membran
- Abbildung 13** Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern nach 48 Stunden bi-axialer Dehnung auf einer lamininbeschichteten Membran
- Abbildung 14** Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern nach 4 Stunden bi-axialer Dehnung, Vergleich zwischen kollagen- und lamininbeschichteten Membranen

- Abbildung 15** Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern nach 24 Stunden bi-axialer Dehnung, Vergleich zwischen kollagen- und lamininbeschichteten Membranen
- Abbildung 16** Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern nach 48 Stunden bi-axialer Dehnung, Vergleich zwischen kollagen- und lamininbeschichteten Membranen
- Abbildung 17** Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von osteogenen Markern nach 4 Stunden bi-axialer Dehnung auf einer kollagenbeschichteten Membran
- Abbildung 18** Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von osteogenen Markern nach 24 Stunden bi-axialer Dehnung auf einer kollagenbeschichteten Membran
- Abbildung 19** Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von osteogenen Markern nach 48 Stunden bi-axialer Dehnung auf einer kollagenbeschichteten Membran
- Abbildung 20** Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von osteogenen Markern nach 4 Stunden bi-axialer Dehnung auf einer lamininbeschichteten Membran
- Abbildung 21** Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von osteogenen Markern nach 24 Stunden bi-axialer Dehnung auf einer lamininbeschichteten Membran
- Abbildung 22** Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von osteogenen Markern nach 48 Stunden bi-axialer Dehnung auf einer lamininbeschichteten Membran
- Abbildung 23** Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von osteogenen Markern nach 4 Stunden bi-axialer Dehnung, Vergleich zwischen kollagen- und lamininbeschichteten Membranen
- Abbildung 24** Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von osteogenen Markern nach 24 Stunden bi-axialer Dehnung, Vergleich zwischen kollagen- und lamininbeschichteten Membranen
- Abbildung 25** Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von osteogenen Markern nach 48 Stunden bi-axialer Dehnung, Vergleich zwischen kollagen- und lamininbeschichteten Membranen

- Abbildung 26** SDS-Page zur Analyse der Proteinexpression in kardialen Fibroblasten in Abhängigkeit von mechanischer Stimulation durch biaxiale Dehnung auf einer kollagenbeschichteten Membran
- Abbildung 27** SDS-Page zur Analyse der Proteinexpression in kardialen Fibroblasten in Abhängigkeit von mechanischer Stimulation durch biaxiale Dehnung auf einer kollagenbeschichteten Membran
- Abbildung 28** SDS-Page zur Analyse der Proteinexpression in kardialen Fibroblasten in Abhängigkeit von mechanischer Stimulation durch biaxiale Dehnung auf einer lamininbeschichteten Membran
- Abbildung 29** SDS-Page zur Analyse der Proteinexpression in kardialen Fibroblasten in Abhängigkeit von mechanischer Stimulation durch biaxiale Dehnung auf einer lamininbeschichteten Membran
- Abbildung 30** Mikroskopische Betrachtung von kardialen Fibroblasten in Kultur mit Hydrogenbeschichtung
- Abbildung 31** Mikroskopische Betrachtung von kardialen Fibroblasten in Kultur auf Hydrogenbeschichtung mittels Immunfluoreszenzfärbung
- Abbildung 32** Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern nach 24 Stunden Kultivierung auf Hydrogelen verschiedener Porengrößen
- Abbildung 33** Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern nach 48 Stunden Kultivierung auf Hydrogelen verschiedener Porengrößen
- Abbildung 34** Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern nach 72 Stunden Kultivierung auf Hydrogelen verschiedener Porengrößen
- Abbildung 35** Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von osteogenen Markern nach 24 Stunden Kultivierung auf Hydrogelen verschiedener Porengrößen
- Abbildung 36** Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von osteogenen Markern nach 48 Stunden Kultivierung auf Hydrogelen verschiedener Porengrößen
- Abbildung 37** Grafische Darstellung der Veränderung der Expression von osteogenen Markern nach 72 Stunden Kultivierung auf Hydrogelen verschiedener Porengrößen
- Abbildung 38** SDS-Page zur Analyse der Proteinexpression in kardialen Fibroblasten in Abhängigkeit von der Porengröße der Hydrogele, auf denen die Zellen kultiviert wurden

**Abbildung 39** Schematische Darstellung der Aktivierung von kardialen Fibroblasten durch mechanische Stimulation

## 9. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b>	Hämodynamische Profile der pulmonalen Hypertonie (Condon et al. 2019)
<b>Tabelle 2</b>	Klassifikation der pulmonalen Hypertonie nach der Nizzakonferenz 2013, überarbeitet auf dem 6. WSPH 2018 (Herold, 2018; Simonneau et al., 2019)
<b>Tabelle 3</b>	Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation zur Einschätzung des funktionellen Status von Patienten mit PAH (Deutsche Gesellschaft für Kardiologie e.V., 2022)
<b>Tabelle 4</b>	Auflistung der verwendeten Materialien für die Zellkultur
<b>Tabelle 5</b>	Auflistung der verwendeten Materialien SDS-Page
<b>Tabelle 6</b>	Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Puffer
<b>Tabelle 7</b>	Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien
<b>Tabelle 8</b>	Auflistung der verwendeten Geräte
<b>Tabelle 9</b>	Auflistung der verwendeten Software
<b>Tabelle 10</b>	Auflistung verwendeter Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung
<b>Tabelle 11</b>	Auflistung der Komponenten für einen qPCR-Ansatz
<b>Tabelle 12</b>	Thermalprofil qPCR
<b>Tabelle 13</b>	Auflistung verwendeter Primer für qPCR
<b>Tabelle 14</b>	Zusammensetzung von Lauf- und Sammelgel für SDS-Page
<b>Tabelle 15</b>	Auflistung verwendeter Antikörper für SDS-Page
<b>Tabelle 16</b>	Auflistung untersuchter Zellmarker zur Charakterisierung der verwendeten Zellen

## 10. Literaturverzeichnis

- Acharya, P. S., Zukas, A., Chandan, V., Katzenstein, A. L., & Puré, E.** (2006). Fibroblast activation protein: a serine protease expressed at the remodeling interface in idiopathic pulmonary fibrosis. *Human pathology*, 37(3), 352–360. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2005.11.020>
- Ali, S. R., Ranjbarvaziri, S., Talkhabi, M., Zhao, P., Subat, A., Hojjat, A., Kamran, P., Müller, A. M., Volz, K. S., Tang, Z., Red-Horse, K., & Ardehali, R.** (2014). Developmental heterogeneity of cardiac fibroblasts does not predict pathological proliferation and activation. *Circulation research*, 115(7), 625–635. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.303794>
- Antwerpes, F., von Westphalen, G., No, Zensen, S.** (2013, 18. Juli) Mechanik. Abgerufen am 17. Januar 2024, von <https://flexikon.doccheck.com/de/Mechanik>
- Asli, N.S., Xaymardan, M., Forte, E., Waardenberg, A.J., Cornwell, J.A., Janbandhu, V., Kesteven, S., Chandrakanthan, V., Malinowska, H., Reinhard, H., Yang, S.F., Pickett, H.A., Schofield, P., Christ, D., Ahmed, I., Chong, J.J., Heffernan, C., Li, J., Simonian, M.R., Bouveret, R., Srivastava, S., Mishra, R.K., Dhawan, J., Nordon, R.E., Macdonald, P., Graham, R.M., Feneley, M.P., & Harvey, R.P.** (2017). PDGFR $\alpha$  signaling in cardiac fibroblasts modulates quiescence, metabolism and self-renewal, and promotes anatomical and functional repair. *bioRxiv*. p. 225979. <https://doi.org/10.1101/225979>
- Atance, J., Yost, M. J., & Carver, W.** (2004). Influence of the extracellular matrix on the regulation of cardiac fibroblast behavior by mechanical stretch. *Journal of cellular physiology*, 200(3), 377–386. <https://doi.org/10.1002/jcp.20034>
- Baudino, T. A., Carver, W., Giles, W., & Borg, T. K.** (2006). Cardiac fibroblasts: friend or foe?. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 291(3), H1015–H1026. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00023.2006>
- Behrends, J., Bischofberger, J., Deutzmann, R., Ehmke H., Frings, M., Grissmer, S., Hoth, M., Kurtz, A., Leipziger, J., Müller, F., Pedain, C., Rettig, I. & Wagner, C.** (2012). *Duale Reihe: Physiologie* (7. Auflage). Thieme.
- Benza, R. L., Miller, D. P., Barst, R. J., Badesch, D. B., Frost, A. E., & McGoon, M. D.** (2012). An evaluation of long-term survival from time of diagnosis in pulmonary arterial hypertension from the REVEAL Registry. *Chest*, 142(2), 448–456. <https://doi.org/10.1378/chest.11-1460>
- Berry, C. C., Shelton, J. C., Bader, D. L., & Lee, D. A.** (2003). Influence of external uniaxial cyclic strain on oriented fibroblast-seeded collagen gels. *Tissue engineering*, 9(4), 613–624. <https://doi.org/10.1089/107632703768247313>

- Biswas, H., & Longmore, G. D.** (2016). Action of SNAIL1 in Cardiac Myofibroblasts Is Important for Cardiac Fibrosis following Hypoxic Injury. *PloS one*, *11*(10), e0162636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162636>
- Boye, K., & Maelandsmo, G. M. (2010). S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles. *The American journal of pathology*, *176*(2), 528–535. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090526>
- Braun, J., Müller-Wieland, D., Renz-Polster, H. & Krautzig, S.** (2018). Basislehrbuch Innere Medizin (6. Auflage). Elsevier GmbH Deutschland. <https://doi.org/10.1055/b-002-23567>
- Buckley, M. S., Staib, R. L., Wicks, L. M., & Feldman, J. P.** (2010). Phosphodiesterase-5 inhibitors in management of pulmonary hypertension: safety, tolerability, and efficacy. *Drug, healthcare and patient safety*, *2*, 151–161. <https://doi.org/10.2147/DHPS.S6215>
- Burlew, B. S., & Weber, K. T.** (2002). Cardiac fibrosis as a cause of diastolic dysfunction. *Herz*, *27*(2), 92–98. <https://doi.org/10.1007/s00059-002-2354-y>
- Channick, R. N., Sitbon, O., Barst, R. J., Manes, A., & Rubin, L. J.** (2004). Endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, *43*(12 Suppl S), 62S–67S. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.02.042>
- Chiquet M.** (1999). Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, *18*(5), 417–426. [https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(99\)00039-6](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(99)00039-6)
- Condon, D. F., Nickel, N. P., Anderson, R., Mirza, S., & de Jesus Perez, V. A.** (2019). The 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension: what's old is new. *F1000Research*, *8*, F1000 Faculty Rev-888. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18811.1>
- Davis, J., & Molkentin, J. D.** (2014). Myofibroblasts: trust your heart and let fate decide. *Journal of molecular and cellular cardiology*, *70*, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.10.019>
- Del Pozo, R., Hernandez Gonzalez, I., & Escribano-Subias, P.** (2017). The prostacyclin pathway in pulmonary arterial hypertension: a clinical review. *Expert review of respiratory medicine*, *11*(6), 491–503. <https://doi.org/10.1080/17476348.2017.1317599>
- Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V.** (2022). ESC POCKET GUIDELINES Pulmonale Hypertonie (Version 2022). Börm Bruckmeier Verlag GmbH.

**Eckes, B., Kessler, D., Aumailley, M. & Krieg, T.** (2000). Interactions of fibroblasts with the extracellular matrix: implications for the understanding of fibrosis. *Springer Semin Immunopathol* 21(4), 415–429.  
<https://doi.org/10.1007/s002810000034>

**Fan, D., Takawale, A., Lee, J., & Kassiri, Z.** (2012). Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis & tissue repair*, 5(1), 15.  
<https://doi.org/10.1186/1755-1536-5-15>

**Farina, G., Lemaire, R., Korn, J. H., & Widom, R. L.** (2006). Cartilage oligomeric matrix protein is overexpressed by scleroderma dermal fibroblasts. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 25(4), 213–222.  
<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2006.01.007>

**Foris, V., Kovacs, G., Olschewski, H.** (2017). Pulmonale Hypertonie. *Zeitschrift für Pneumologie* 2/17, 117-126. Springer Medizin.  
<https://doi.org/10.1007/s10405-017-0097-y>

**Frangogiannis N. G.** (2012). Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease. *Physiological reviews*, 92(2), 635–688.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2011>

**Fu, X., Khalil, H., Kanisicak, O., Boyer, J. G., Vagnozzi, R. J., Maliken, B. D., Sargent, M. A., Prasad, V., Valiente-Alandi, I., Blaxall, B. C., & Molkentin, J. D.** (2018). Specialized fibroblast differentiated states underlie scar formation in the infarcted mouse heart. *The Journal of clinical investigation*, 128(5), 2127–2143.  
<https://doi.org/10.1172/JCI98215>

**Gladka, M. M., Molenaar, B., de Ruiter, H., van der Elst, S., Tsui, H., Versteeg, D., Lacraz, G. P. A., Huibers, M. M. H., van Oudenaarden, A., & van Rooij, E.** (2018). Single-Cell Sequencing of the Healthy and Diseased Heart Reveals Cytoskeleton-Associated Protein 4 as a New Modulator of Fibroblasts Activation. *Circulation*, 138(2), 166–180. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030742>

**Goldsmith, E. C., Bradshaw, A. D., Zile, M. R., & Spinale, F. G.** (2014). Myocardial fibroblast-matrix interactions and potential therapeutic targets. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 70, 92–99.  
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.01.008>

**Goldsmith, E. C., Bradshaw, A. D., Zile, M. R., & Spinale, F. G.** (2014). Myocardial fibroblast-matrix interactions and potential therapeutic targets. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 70, 92–99.  
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.01.008>

**Gubbiotti, M. A., Neill, T., Frey, H., Schaefer, L., & Iozzo, R. V.** (2015). Decorin is an autophagy-inducible proteoglycan and is required for proper in vivo autophagy. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 48, 14–25.  
<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.09.001>

**Herold G.** (2017). HEROLD Innere Medizin 2018. Herold, Gerd.

- Herum, K. M., Choppe, J., Kumar, A., Engler, A. J., & McCulloch, A. D.** (2017). Mechanical regulation of cardiac fibroblast profibrotic phenotypes. *Molecular biology of the cell*, *28*(14), 1871–1882.  
<https://doi.org/10.1091/mbc.E17-01-0014>
- Hinz B.** (2009). Tissue stiffness, latent TGF-beta1 activation, and mechanical signal transduction: implications for the pathogenesis and treatment of fibrosis. *Current rheumatology reports*, *11*(2), 120–126.  
<https://doi.org/10.1007/s11926-009-0017-1>
- Hinz, B., & Gabbiani, G.** (2003). Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Current opinion in biotechnology*, *14*(5), 538–546.  
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2003.08.006>
- Hsu, H. J., Lee, C. F., Locke, A., Vanderzyl, S. Q., & Kaunas, R.** (2010). Stretch-induced stress fiber remodeling and the activations of JNK and ERK depend on mechanical strain rate, but not FAK. *PloS one*, *5*(8), e12470.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012470>
- Hynes R. O.** (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, *110*(6), 673–687.  
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00971-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00971-6)
- Ichikawa, O., Osawa, M., Nishida, N., Goshima, N., Nomura, N., & Shimada, I.** (2007). Structural basis of the collagen-binding mode of discoidin domain receptor 2. *The EMBO journal*, *26*(18), 4168–4176.  
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601833>
- Ivey, M. J., Kuwabara, J. T., Riggsbee, K. L., & Tallquist, M. D.** (2019). Platelet-derived growth factor receptor- $\alpha$  is essential for cardiac fibroblast survival. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, *317*(2), H330–H344.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00054.2019>
- Kim, H. J., Kim, J. H., Bae, S. C., Choi, J. Y., Kim, H. J., & Ryoo, H. M.** (2003). The protein kinase C pathway plays a central role in the fibroblast growth factor-stimulated expression and transactivation activity of Runx2. *The Journal of biological chemistry*, *278*(1), 319–326. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203750200>
- Kisselbach, L., Merges, M., Bossie, A., & Boyd, A.** (2009). CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures. *Cytotechnology*, *59*(1), 31–44.  
<https://doi.org/10.1007/s10616-009-9190-3>
- Krenning, G., Zeisberg, E. M., & Kalluri, R.** (2010). The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *Journal of cellular physiology*, *225*(3), 631–637.  
<https://doi.org/10.1002/jcp.22322>

**Lai, Y. C., Potoka, K. C., Champion, H. C., Mora, A. L., & Gladwin, M. T.** (2014). Pulmonary arterial hypertension: the clinical syndrome. *Circulation research*, *115*(1), 115–130.

<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.301146>

**Landry, N. M., Cohen, S., & Dixon, I. M. C.** (2017). Periostin in cardiovascular disease and development: a tale of two distinct roles. *Basic research in cardiology*, *113*(1), 1. <https://doi.org/10.1007/s00395-017-0659-5>

**Leitinger B.** (2003). Molecular analysis of collagen binding by the human discoidin domain receptors, DDR1 and DDR2. Identification of collagen binding sites in DDR2. *The Journal of biological chemistry*, *278*(19), 16761–16769. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301370200>

**Lian, T. Y., Jiang, X., & Jing, Z. C.** (2017). Riociguat: a soluble guanylate cyclase stimulator for the treatment of pulmonary hypertension. *Drug design, development and therapy*, *11*, 1195–1207. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S117277>

**Liu, C., Shao, Z. M., Zhang, L., Beatty, P., Sartippour, M., Lane, T., Livingston, E., & Nguyen, M.** (2001). Human endomucin is an endothelial marker. *Biochemical and biophysical research communications*, *288*(1), 129–136. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5737>

**López, B., González, A., Hermida, N., Valencia, F., de Teresa, E., & Díez, J.** (2010). Role of lysyl oxidase in myocardial fibrosis: from basic science to clinical aspects. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, *299*(1), H1–H9. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00335.2010>

**Lüllmann-Rauch, R. & Asan, E.** (2015) Taschenbuch Histologie (5. Auflage). Georg Thieme Verlag.

**MacKenna, D. A., Dolfi, F., Vuori, K., & Ruoslahti, E.** (1998). Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase activation by mechanical stretch is integrin-dependent and matrix-specific in rat cardiac fibroblasts. *The Journal of clinical investigation*, *101*(2), 301–310. <https://doi.org/10.1172/JCI1026>

**MacKenna, D., Summerour, S. R., & Villarreal, F. J.** (2000). Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. *Cardiovascular research*, *46*(2), 257–263. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(00\)00030-4](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(00)00030-4)

**Meyer, F. J., Katus, H. A., & Borst, M. M.** (2008). Pulmonale Hypertonie und Rechtsherzversagen auf der Intensivstation [Pulmonary hypertension and right ventricular failure in critical care medicine]. *Der Pneumologe*, *5*(3), 163–174. <https://doi.org/10.1007/s10405-008-0232-x>

**Montani, D., Günther, S., Dorfmueller, P., Perros, F., Girerd, B., Garcia, G., Jaïs, X., Savale, L., Artaud-Macari, E., Price, L. C., Humbert, M., Simonneau, G., & Sitbon, O.** (2013). Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet journal of rare diseases*, 8, 97. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-97>

**Morgan, K. Y., & Black, L. D., 3rd** (2017). Investigation into the effects of varying frequency of mechanical stimulation in a cycle-by-cycle manner on engineered cardiac construct function. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 11(2), 342–353. <https://doi.org/10.1002/term.1915>

**Mullin, C. J., & Klinger, J. R.** (2018). Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Heart failure clinics*, 14(3), 339–351. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2018.02.009>

**Nimni M. E.** (1983). Collagen: structure, function, and metabolism in normal and fibrotic tissues. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 13(1), 1–86. [https://doi.org/10.1016/0049-0172\(83\)90024-0](https://doi.org/10.1016/0049-0172(83)90024-0)

**Oka, T., Xu, J., Kaiser, R. A., Melendez, J., Hambleton, M., Sargent, M. A., Lorts, A., Brunskill, E. W., Dorn, G. W., 2nd, Conway, S. J., Aronow, B. J., Robbins, J., & Molkentin, J. D.** (2007). Genetic manipulation of periostin expression reveals a role in cardiac hypertrophy and ventricular remodeling. *Circulation research*, 101(3), 313–321. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.149047>

**Okamoto, H., & Imanaka-Yoshida, K.** (2012). Matricellular proteins: new molecular targets to prevent heart failure. *Cardiovascular therapeutics*, 30(4), e198–e209. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5922.2011.00276.x>

**Olschewski, H., Rose, F., Schermuly, R., Ghofrani, H. A., Enke, B., Olschewski, A., & Seeger, W.** (2004). Prostacyclin and its analogues in the treatment of pulmonary hypertension. *Pharmacology & therapeutics*, 102(2), 139–153. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.01.003>

**Opitz, C. Rosenkranz, S., Ghofrani, H.A., Grünig, E., Klose, H., Olschewski, H. & Hoepfer, M.** (2016) ESC-Leitlinie 2015: Diagnostik und Therapie. *Dtsch Med Wochenschr*; 141: 1764–1769. <https://doi.org/10.1055/s-0042-117784>

**Pape, H., Kurtz, A. & Silbernagl, S.** (2019) Physiologie (9. Auflage). Thieme. <https://doi.org/10.1055/b-006-163285>

**Poelmann, R. E., Gittenberger-de Groot, A. C., & Hierck, B. P.** (2008). The development of the heart and microcirculation: role of shear stress. *Medical & biological engineering & computing*, 46(5), 479–484. <https://doi.org/10.1007/s11517-008-0304-4>

**Posey, K. L., Coustry, F., & Hecht, J. T.** (2018). Cartilage oligomeric matrix protein: COMPopathies and beyond. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 71-72, 161–173. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.02.023>

**Rabinovitch M.** (2012). Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *The Journal of clinical investigation*, 122(12), 4306–4313.  
<https://doi.org/10.1172/JCI60658>

**Reesink, H. J., Marcus, J. T., Tulevski, I. I., Jamieson, S., Kloek, J. J., Vonk Noordegraaf, A., & Bresser, P.** (2007). Reverse right ventricular remodeling after pulmonary endarterectomy in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension: utility of magnetic resonance imaging to demonstrate restoration of the right ventricle. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 133(1), 58–64.  
<https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2006.09.032>

**Ren, X., Johns, R. A., & Gao, W. D.** (2019). Right Heart in Pulmonary Hypertension: From Adaptation to Failure. *Pulmonary circulation*, 9(3).  
<https://doi.org/10.1177/2045894019845611>

**Rich, S.** (2012). Right Ventricular Adaptation and Maladaptation in Chronic Pulmonary Arterial Hypertension. *Cardiol Clin*, vol. 30, 257–269.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccl.2012.03.004>

**Rockey, D. C., Weymouth, N., & Shi, Z.** (2013). Smooth muscle  $\alpha$  actin (Acta2) and myofibroblast function during hepatic wound healing. *PloS one*, 8(10), e77166.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077166>

**Rog-Zielinska, E. A., Norris, R. A., Kohl, P., & Markwald, R.** (2016). The Living Scar--Cardiac Fibroblasts and the Injured Heart. *Trends in molecular medicine*, 22(2), 99–114. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.12.006>

**Satelli, A., & Li, S.** (2011). Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 68(18), 3033–3046.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-011-0735-1>

**Schellings, M. W., Pinto, Y. M., & Heymans, S.** (2004). Matricellular proteins in the heart: possible role during stress and remodeling. *Cardiovascular research*, 64(1), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.06.006>

**Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Wilkins, M. R., & Grimminger, F.** (2011). Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nature reviews. Cardiology*, 8(8), 443–455. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2011.87>

**Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M. & Wesker, K.** (2009). Prometheus Lernatlas der Anatomie – Innere Organe (2. Auflage). Thieme. <https://doi.org/10.1055/b-004-134446>

**Shimazaki, M., Nakamura, K., Kii, I., Kashima, T., Amizuka, N., Li, M., Saito, M., Fukuda, K., Nishiyama, T., Kitajima, S., Saga, Y., Fukayama, M., Sata, M., & Kudo, A.** (2008). Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction. *The Journal of experimental medicine*, 205(2), 295–303.  
<https://doi.org/10.1084/jem.20071297>

- Shinde, A. V., Humeres, C., & Frangogiannis, N. G.** (2017). The role of  $\alpha$ -smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1863(1), 298–309. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.006>
- Shindo, K., Asakura, M., Min, K., Ito, S., Fu, H.Y., Yamazaki, S., Takahashi, A., Imazu, M., Fukuda, H., Nakajima, Y., Asanuma, H., Minamino, T., Takashima, S., Minamino, N., Mochizuki, N., & Kitakaze, M.** (2017). Cartilage Intermediate Layer Protein 1 Suppresses TGF- $\beta$  Signaling in Cardiac Fibroblasts. *International Journal of Gerontology*, 11, 67-74. <https://doi.org/10.1016/J.IJGE.2017.01.002>
- Simonneau, G., Montani, D., Celermajer, D. S., Denton, C. P., Gatzoulis, M. A., Krowka, M., Williams, P. G., & Souza, R.** (2019). Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *The European respiratory journal*, 53(1), 1801913. <https://doi.org/10.1183/13993003.01913-2018>
- Snider, P., Standley, K. N., Wang, J., Azhar, M., Doetschman, T., & Conway, S. J.** (2009). Origin of cardiac fibroblasts and the role of periostin. *Circulation research*, 105(10), 934–947. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.201400>
- Souders, C. A., Bowers, S. L. K., & Baudino, T. A.** (2009). Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circulation research*, 105(12), 1164–1176. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.209809>
- Suresh, K., & Shimoda, L. A.** (2016). Lung Circulation. *Comprehensive Physiology*, 6(2), 897–943. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140049>
- Tarbit, E., Singh, I., Peart, J. N., & Rose'Meyer, R. B.** (2019). Biomarkers for the identification of cardiac fibroblast and myofibroblast cells. *Heart failure reviews*, 24(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10741-018-9720-1>
- Throm Quinlan, A. M., Sierad, L. N., Capulli, A. K., Firstenberg, L. E., & Billiar, K. L.** (2011). Combining dynamic stretch and tunable stiffness to probe cell mechanobiology in vitro. *PloS one*, 6(8), e23272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023272>
- Tillmanns, J., Hoffmann, D., Habbaba, Y., Schmitto, J. D., Sedding, D., Fraccarollo, D., Galuppo, P., & Bauersachs, J.** (2015). Fibroblast activation protein alpha expression identifies activated fibroblasts after myocardial infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 87, 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.08.016>
- Trotter, J., Karram, K., & Nishiyama, A.** (2010). NG2 cells: Properties, progeny and origin. *Brain research reviews*, 63(1-2), 72–82. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.12.006>

**van Nieuwenhoven, F. A., Munts, C., Op't Veld, R. C., González, A., Díez, J., Heymans, S., Schroen, B., & van Bilsen, M.** (2017). Cartilage intermediate layer protein 1 (CILP1): A novel mediator of cardiac extracellular matrix remodelling. *Scientific reports*, 7(1), 16042. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16201-y>

**van Putten, S., Shafieyan, Y., & Hinz, B.** (2016). Mechanical control of cardiac myofibroblasts. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 93, 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.11.025>

**Vonk Noordegraaf, A., Westerhof, B. E., & Westerhof, N.** (2017). The Relationship Between the Right Ventricle and its Load in Pulmonary Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 69(2), 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.10.047>

**Vonk-Noordegraaf, A., Haddad, F., Chin, K. M., Forfia, P. R., Kawut, S. M., Lumens, J., Naeije, R., Newman, J., Oudiz, R. J., Provencher, S., Torbicki, A., Voelkel, N. F., & Hassoun, P. M.** (2013). Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: physiology and pathobiology. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(25 Suppl), D22–D33. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.10.027>

**Vuga, L. J., Milosevic, J., Pandit, K., Ben-Yehudah, A., Chu, Y., Richards, T., Sciruba, J., Myerburg, M., Zhang, Y., Parwani, A. V., Gibson, K. F., & Kaminski, N.** (2013). Cartilage oligomeric matrix protein in idiopathic pulmonary fibrosis. *PloS one*, 8(12), e83120. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083120>

**Wang, H. B., Dembo, M., Hanks, S. K., & Wang, Y.** (2001). Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), 11295–11300. <https://doi.org/10.1073/pnas.201201198>

**Wang, N., & Stamenovic, D.** (2002). Mechanics of vimentin intermediate filaments. *Journal of muscle research and cell motility*, 23(5-6), 535–540. <https://doi.org/10.1023/a:1023470709071>

**Wetsch, W. A., Lahm, T., Hinkelbein, J., Happel, C. M., & Padosch, S. A.** (2011). Herzinsuffizienz - Das akute Rechtsherzversagen [Cardiac insufficiency: acute right heart failure]. *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie : AINS*, 46(11-12), 718–725. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1297178>

**Wilting, J.** (2010). Frühentwicklung. In: *Anatomie (2. Auflage)*. Springer.

**Yeung, T., Georges, P. C., Flanagan, L. A., Marg, B., Ortiz, M., Funaki, M., Zahir, N., Ming, W., Weaver, V., & Janmey, P. A.** (2005). Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell motility and the cytoskeleton*, 60(1), 24–34. <https://doi.org/10.1002/cm.20041>

**Zhang, K., Corsa, C. A., Ponik, S. M., Prior, J. L., Piwnica-Worms, D., Eliceiri, K. W., Keely, P. J., & Longmore, G. D.** (2013). The collagen receptor discoidin domain receptor 2 stabilizes SNAIL1 to facilitate breast cancer metastasis. *Nature cell biology*, *15*(6), 677–687. <https://doi.org/10.1038/ncb2743>

**Zhang, W., Ge, Y., Cheng, Q., Zhang, Q., Fang, L., & Zheng, J.** (2018). Decorin is a pivotal effector in the extracellular matrix and tumour microenvironment. *Oncotarget*, *9*(4), 5480–5491. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23869>

**Zhou, P., & Pu, W. T.** (2016). Recounting Cardiac Cellular Composition. *Circulation research*, *118*(3), 368–370. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308139>

## 11. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

**Ort/Datum**

---

**Unterschrift**

## 12. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die auf unterschiedlichste Art und Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ich bedanke mich bei...

... Prof. Dr. Ralph Schermuly für die Vergabe des interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die stetige Unterstützung sowie für die Begutachtung dieser Arbeit.

... allen Mitgliedern der AG Schermuly im BFS und ECCPS für die stetige Hilfsbereitschaft und die angenehme Zeit miteinander.

... Mario für die Begleitung und die Geduld während der gesamten Zeit.

... Tim für die grammatischen Hilfestellungen.

... Beate und Mona, ohne die ich bei der Arbeit im Labor wohl aufgeschmissen gewesen wäre und die nie nein zu einer Tasse Kaffee gesagt haben.

Der größte Dank gilt meinen Eltern Kirsten und Bernd für die bedingungslose Unterstützung während meines gesamten Studiums, die Geduld, das Vertrauen und ein offenes Ohr zu jeder Tages- und Nachtzeit.