## Der Einsatz von Granulocyte-Colony Stimulating Factor zur Behandlung der diastolischen Funktionsstörung im Mausmodell

### Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

> vorgelegt von Jacobi, Stella Nadine aus Frankfurt am Main

> > Gießen (2021)

I

### Aus der Abteilung für Experimentelle Kardiologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. Christian Hamm

Aus dem Campus Kerckhoff der Justus-Liebig-Universität Gießen und ihres Fachbereichs Medizin

Betreuer: Herr PD Dr. Christian Troidl Gutachterin: Frau Prof. Dr. Susanne Rohrbach

Tag der Disputation: 23.02.2021

# Inhaltsverzeichnis

| 1.    | Einleitung   | 1  |
|-------|--|----|
| 1.1   | Definition und Epidemiologie der diastolischen Herzinsuffizienz  | 2  |
| 1.2   | Pathophysiologie der diastolischen Herzinsuffizienz  | 5  |
| 1.3   | Zelluläre Mechanismen und Veränderungen im Rahmen der DHF  | 7  |
| 1.3.1 | Veränderungen der Strukturproteine   | 9  |
| 1.4   | Zelluläre Grundlagen der kardialen Kontraktilität und Relaxation   | 10 |
| 1.5   | Myokardiales Remodeling- Veränderungen der myokardialen Steifigkeit  | 11 |
| 1.5.1 | Strukturelles Remodeling: Veränderungen der extrazellulären Matrix   | 12 |
| 1.5.2 | Myokardiales Remodeling und Inflammation   | 13 |
| 1.5.3 | Elektromechanisches Remodeling   | 16 |
| 1.6   | Pathophysiologische Bedeutung von Angiotensin II für die Entwicklung der<br>diastolischen Herzinsuffizienz | 17 |
| 1.7   | Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF)  | 19 |
| 1.7.1 | G-CSF im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen  | 20 |
| 1.7.2 | G-CSF und Inflammation   | 21 |
| 1.8   | Projektbeschreibung  | 22 |
| 1.9   | Zielsetzung und Fragestellung  | 26 |
| 2.    | Material und Methoden  | 27 |
| 2.1   | Tierexperimentelle Methoden  | 27 |
| 2.2   | Echokardiographie  | 31 |
| 2.3   | Molekularbiologische und histologische Methoden  | 32 |
| 2.3.1 | Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)                                     | 32 |
| 2.3.2 | Western Blot   | 37 |
| 2.3.3 | Histologische Methoden   | 41 |
| 2.4   | Statistische Methoden  | 44 |

| 3.   | Ergebnisse   | . 45   |
|--|--|--|
| 3.1  | Effizienz des Tiermodells  | . 45   |
| 3.2  | Diastolische Funktionsstörung in der Echokardiographie   | . 46   |
| 3.3  | qRT-PCR: BNP   | . 48   |
| 3.4  | Der Einfluss von G-CSF auf die myokardiale Fibrose   | . 48   |
| 3.5  | Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen-I   | . 51   |
| 3.6  | Western Blot Kollagen-I  | . 52   |
| 3.7  | Der Einfluss von G-CSF auf Entzündungsprozesse   | . 53   |
| 3.8  | G-CSF und die klassischen Inflammations-Zytokine   | . 55   |
| 3.9  | G-CSF und die Inflammationstargets Lactoferrin und Cathelicidin  | . 56   |
| 3.10   | G-CSF und Gap Junction Remodeling  | . 58   |
| 3.10.1   | Connexin-43  | . 58   |
| 3.10.2   | β-Catenin 60   |  |
| 4.   | Diskussion   | . 62   |
| 4.1  | Zusammenfassung der Ergebnisse   | . 62   |
|  |  |  |
| 4.2  | Effizienz des Tiermodells  | . 63   |
| 4.2<br>4.3   | Effizienz des Tiermodells<br>G-CSF und die Wirkung auf den Metabolismus der extrazellulären Matrix   | . 63<br>. 66   |
| 4.2<br>4.3<br>4.4  | Effizienz des Tiermodells<br>G-CSF und die Wirkung auf den Metabolismus der extrazellulären Matrix<br>Der Einfluss G-CSF auf das inflammatorische Geschehen  | . 63<br>. 66<br>. 68   |
| <ul><li>4.2</li><li>4.3</li><li>4.4</li><li>4.5</li></ul>  | Effizienz des Tiermodells<br>G-CSF und die Wirkung auf den Metabolismus der extrazellulären Matrix<br>Der Einfluss G-CSF auf das inflammatorische Geschehen<br>G-CSF und die Inflammationstargets CAMP und LTF   | . 63<br>. 66<br>. 68<br>. 69   |
| <ul> <li>4.2</li> <li>4.3</li> <li>4.4</li> <li>4.5</li> <li>4.6</li> </ul>  | Effizienz des Tiermodells<br>G-CSF und die Wirkung auf den Metabolismus der extrazellulären Matrix<br>Der Einfluss G-CSF auf das inflammatorische Geschehen<br>G-CSF und die Inflammationstargets CAMP und LTF<br>Der Einfluss von G-CSF auf Parameter der elektromechanischen Kopplung  | . 63<br>. 66<br>. 68<br>. 69<br>. 71   |
| <ul> <li>4.2</li> <li>4.3</li> <li>4.4</li> <li>4.5</li> <li>4.6</li> <li>4.6.1</li> </ul>   | Effizienz des Tiermodells<br>G-CSF und die Wirkung auf den Metabolismus der extrazellulären Matrix<br>Der Einfluss G-CSF auf das inflammatorische Geschehen<br>G-CSF und die Inflammationstargets CAMP und LTF<br>Der Einfluss von G-CSF auf Parameter der elektromechanischen Kopplung<br>Connexin-43   | . 63<br>. 66<br>. 68<br>. 69<br>. 71   |
| <ul> <li>4.2</li> <li>4.3</li> <li>4.4</li> <li>4.5</li> <li>4.6</li> <li>4.6.1</li> <li>4.6.2</li> </ul>  | Effizienz des Tiermodells<br>G-CSF und die Wirkung auf den Metabolismus der extrazellulären Matrix<br>Der Einfluss G-CSF auf das inflammatorische Geschehen<br>G-CSF und die Inflammationstargets CAMP und LTF<br>Der Einfluss von G-CSF auf Parameter der elektromechanischen Kopplung<br>Connexin-43<br>Nachweis der Connexin-43-Erhöhung über β-Catenin   | . 63<br>. 66<br>. 68<br>. 69<br>. 71<br>. 71   |
| <ul> <li>4.2</li> <li>4.3</li> <li>4.4</li> <li>4.5</li> <li>4.6</li> <li>4.6.1</li> <li>4.6.2</li> <li>4.7</li> </ul>   | Effizienz des Tiermodells<br>G-CSF und die Wirkung auf den Metabolismus der extrazellulären Matrix<br>Der Einfluss G-CSF auf das inflammatorische Geschehen<br>G-CSF und die Inflammationstargets CAMP und LTF<br>Der Einfluss von G-CSF auf Parameter der elektromechanischen Kopplung<br>Connexin-43<br>Nachweis der Connexin-43-Erhöhung über β-Catenin<br>Klinische Bedeutung  | . 63<br>. 66<br>. 68<br>. 69<br>. 71<br>. 71<br>. 72<br>. 74   |
| <ol> <li>4.2</li> <li>4.3</li> <li>4.4</li> <li>4.5</li> <li>4.6</li> <li>4.6.1</li> <li>4.6.2</li> <li>4.7</li> <li>5.</li> </ol>                                     | Effizienz des Tiermodells<br>G-CSF und die Wirkung auf den Metabolismus der extrazellulären Matrix<br>Der Einfluss G-CSF auf das inflammatorische Geschehen<br>G-CSF und die Inflammationstargets CAMP und LTF<br>Der Einfluss von G-CSF auf Parameter der elektromechanischen Kopplung<br>Connexin-43<br>Nachweis der Connexin-43-Erhöhung über β-Catenin<br>Klinische Bedeutung  | . 63<br>. 66<br>. 68<br>. 69<br>. 71<br>. 71<br>. 71<br>. 72<br>. 74                                 |
| <ol> <li>4.2</li> <li>4.3</li> <li>4.4</li> <li>4.5</li> <li>4.6</li> <li>4.6.1</li> <li>4.6.2</li> <li>4.7</li> <li>5.</li> <li>6.</li> </ol>                         | Effizienz des Tiermodells<br>G-CSF und die Wirkung auf den Metabolismus der extrazellulären Matrix<br>Der Einfluss G-CSF auf das inflammatorische Geschehen<br>G-CSF und die Inflammationstargets CAMP und LTF<br>Der Einfluss von G-CSF auf Parameter der elektromechanischen Kopplung<br>Connexin-43<br>Nachweis der Connexin-43-Erhöhung über β-Catenin<br>Klinische Bedeutung<br>Zusammenfassung/ Summary                          | . 63<br>. 66<br>. 68<br>. 69<br>. 71<br>. 71<br>. 71<br>. 72<br>. 74<br>. 77                         |
| <ol> <li>4.2</li> <li>4.3</li> <li>4.4</li> <li>4.5</li> <li>4.6</li> <li>4.6.1</li> <li>4.6.2</li> <li>4.7</li> <li>5.</li> <li>6.</li> <li>7.</li> </ol>             | Effizienz des Tiermodells<br>G-CSF und die Wirkung auf den Metabolismus der extrazellulären Matrix<br>Der Einfluss G-CSF auf das inflammatorische Geschehen<br>G-CSF und die Inflammationstargets CAMP und LTF<br>Der Einfluss von G-CSF auf Parameter der elektromechanischen Kopplung<br>Connexin-43<br>Nachweis der Connexin-43-Erhöhung über β-Catenin<br>Klinische Bedeutung<br><b>Zusammenfassung/ Summary</b><br><b>Summary</b> | . 63<br>. 66<br>. 68<br>. 69<br>. 71<br>. 71<br>. 71<br>. 72<br>. 74<br>. 77<br>. 79<br>. 81         |
| <ul> <li>4.2</li> <li>4.3</li> <li>4.4</li> <li>4.5</li> <li>4.6</li> <li>4.6.1</li> <li>4.6.2</li> <li>4.7</li> <li>5.</li> <li>6.</li> <li>7.</li> <li>8.</li> </ul> | Effizienz des Tiermodells<br>G-CSF und die Wirkung auf den Metabolismus der extrazellulären Matrix<br>Der Einfluss G-CSF auf das inflammatorische Geschehen<br>G-CSF und die Inflammationstargets CAMP und LTF<br>Der Einfluss von G-CSF auf Parameter der elektromechanischen Kopplung<br>Connexin-43<br>Nachweis der Connexin-43-Erhöhung über β-Catenin<br>Klinische Bedeutung<br>Zusammenfassung/ Summary<br>Publikationen         | . 63<br>. 66<br>. 68<br>. 69<br>. 71<br>. 71<br>. 71<br>. 72<br>. 74<br>. 77<br>. 79<br>. 81<br>. 82 |

| 10.  | Tabellenverzeichnis   | 84 |
|------|---|----|
| 11.  | Literatur   | 85 |
| 12.  | Anhang: Laborzubehör und Material   | 93 |
| 12.1 | Laborgeräte   | 93 |
| 12.2 | Puffer und Lösungen   | 94 |
| 12.3 | Verbrauchsmaterialien   | 95 |
| 12.4 | EDV-Programme   | 96 |
| 12.5 | Verzeichnis der immunhistologisch und im Western Blot verwendeten Antikörper. | 96 |
| 12.6 | Enzyme, Chemikalien und Reagenzien  | 97 |
| 12.7 | Molekularbiologische Kits   | 98 |
| 12.8 | Oligonukleotide/ Primer-Appendix  | 98 |
| 13.  | Erklärung zur Dissertation  | 99 |
| 14.  | Danksagung1   | 00 |

## 1. Einleitung

Die Herzinsuffizienz ist eine weltweit zunehmende Erkrankung mit hoher Morbidität und Mortalität. Eine Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (Heart failure with preserved ejection fraction, HFpEF) liegt dabei bei etwa der Hälfte der Patienten mit Herzinsuffizienz vor [68,93]. Bis zum Jahr 2020 wird die Prävalenz der HFpEF aufgrund der demographischen Entwicklung steigen und das Krankheitsbild der HFpEF zum häufigsten Phänotyp avancieren [96]. Experimentelle Ansätze zur regenerativen Therapie der diastolischen Herzinsuffizienz untersuchen Möglichkeiten zur Reduktion der linksventrikulären Hypertrophie, zur Verbesserung der Compliance durch Reduktion der Kammersteifigkeit/Fibrose, sowie Optionen zur Verbesserung der elektromechanischen Kopplung [12]. Diese zahlreichen Therapieansätze zeigen, dass Vorschläge zur kurativen Therapie der diastolischen Herzinsuffizienz vorliegen, jedoch bis jetzt kein Ansatz bekannt ist, die Morbidität und Mortalität von Patienten mit HFpEF überzeugend zu reduzieren [68].

Die Arbeit geht von der Hypothese aus, dass das Zytokin G-CSF das Inflammationsgeschehen über bisher wenig erforschte Inflammationsmediatoren beeinflusst und damit der Fibroseentstehung entgegenwirkt. Im Rahmen der Pathogenese der diastolischen Herzinsuffizienz werden zahlreiche pro-inflammatorische Mechanismen aktiviert, die über die Beeinflussung des Metabolismus der extrazellulären Matrix (EZM) zur Progredienz der diastolischen Funktionsstörung und konsekutiver diastolischer Herzinsuffizienz beitragen [116,124].

Zudem nehmen wir an, dass sich durch die Reduktion der Fibroseparameter die Synchronisierung der Kontraktionsprozesse der Herzmuskelzellen aufgrund von verbesserter Zell-Zell-Kommunikation verbessert. Zahlreiche Studien konnten bereits zeigen, dass sich die Gabe von G-CSF positiv auf myokardiale Funktionsparameter bei chronischer Herzinsuffizienz auswirkt [101,117].

Mit der vorliegenden Arbeit soll gezeigt werden, ob es durch den Einsatz des Zytokins G-CSF zu einer Reduktion der Fibroseparameter und damit zur Limitierung des kardialen Remodeling im Rahmen der diastolischen Funktionsstörung kommt, und ob die Applikation von G-CSF zur konsekutiven Normalisierung kardialer Funktionsparameter führt.

#### 1.1 Definition und Epidemiologie der diastolischen Herzinsuffizienz

Die chronische Herzinsuffizienz stellt nach wie vor eine der bedeutendsten und häufigsten kardiovaskulären Erkrankung dar und ist damit von enormer sozioökonomischer Relevanz.

Dieser Sachverhalt wird durch zwei Studien betont, die zeigen konnten, dass die Inzidenz und Prävalenz der chronischen Herzinsuffizienz innerhalb der nächsten Jahre aufgrund des wachsenden Durchschnittalters der Bevölkerung noch zunehmen wird [89,98]. Die Prävalenz der Herzinsuffizienz ist stark altersabhängig, beträgt in den ersten fünf Dekaden nur 1%, steigt jedoch auf ca. 10% bei den über 70-Jährigen an [67]. Bis 2020 wird die Prävalenz der HFpEF voraussichtlich auf 8% der Personen älter als 65 Jahre und die relative Prävalenz auf 69% steigen, wodurch die HFpEF zum häufigsten Phänotyp avancieren würde [96].

Den aktuellen Richtlinien der European Society of Cardiology (ESC) entsprechend kann die klinische Diagnose einer Herzinsuffizienz gestellt werden, wenn typische Symptome und klinische Zeichen wie Dyspnoe oder Orthopnoe, schnelle Ermüdbarkeit und Abgeschlagenheit, Flüssigkeitsretention und Ödeme vorliegen, deren Ursache eine kardiale Funktionsstörung ist [68]. Neben dem Vorliegen typischer klinischer Symptome muss der echokardiographische Nachweis einer normalen oder nur geringfügig verminderte Ejektionsfraktion vorliegen, und darüber hinaus eine relevante strukturelle Herzerkrankung bestehen (linksventrikuläre Hypertrophie oder linksatriale Vergrößerung, Vorhofflimmern, erhöhter Brain Natriuretic Peptide (BNP)-Spiegel) und/ oder das Vorliegen einer diastolischen Dysfunktion [68].

Der Schweregrad der Ausprägung der Symptome wird dabei in Abhängigkeit zur Belastung gesetzt und nach der NYHA-Klassifikation in NYHA-Stadien unterteilt. Abhängig von der linksventrikulären Ejektionsfraktion (EF) lässt sich die Herzinsuffizienz in die Herzinsuffizienz mit reduzierter (HFrEF) oder erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF) unterteilen.

Bei über der Hälfte aller Patienten mit symptomatischer Herzinsuffizienz liegt eine Störung der diastolischen Funktion des Herzens bei erhaltener linksventrikulärer Auswurffraktion vor [31,37].

Die diastolische Dysfunktion ist definiert als Störung der diastolischen Funktion mit erhöhtem linksventrikulärem enddiastolischem Druck (LVEDP) bei gleichzeitig erhaltener oder nur gering eingeschränkter linksventrikulärer Funktion. Im medizinischen Sprachgebrauch wird diese Form der Herzinsuffizienz auch als diastolische Herzinsuffizienz (DHF) oder "heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) bezeichnet.

Für die Gruppe um W. Paulus müssen für die Diagnosestellung der HFpEF drei Kriterien erfüllt sein: erstens Symptome oder Zeichen einer Herzinsuffizienz, zweitens der Nachweis einer normalen oder nur leichtgradig eingeschränkten systolischen Ventrikelkontraktilität (Linksventrikuläre EF (LVEF) >50%, und LVEDVI (Left ventricular end-diastolic volume index) < 97mL/m<sup>2</sup>), und drittens eine entweder durch invasive hämodynamische Messung des mittleren Lungenkapillarenverschlussdrucks (mPCW), des links ventrikulären end-diastolischen Drucks (LVEDP), mittels Gewebsdoppler, oder durch Biomarker nachgewiesene diastolische Funktionsstörung [78].

In der klinischen Routine hat sich die Doppler Echokardiographie als Methode der Wahl zur Diagnose der diastolischen Dysfunktion etabliert. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Parameter BNP und NT-proBNP bei Patienten mit moderater und schwerer diastolischer Dysfunktion (DD) im Blut erhöht sind [34]. Es besteht ein Zusammenhang zwischen BNP-Spiegel und der linksventrikulären enddiastolischen Wandspannung, sodass BNP einen wirksamen Surrogat-marker bei sich verschlechternder DD darstellt [41,126].

Im Gegensatz zur systolischen Herzinsuffizienz galt die diastolische Herzinsuffizienz bislang als weniger gravierend und von geringer klinischer und sozioökonomischer Relevanz.

Jedoch unterscheidet sich die Überlebensrate von Patienten mit HF-PEF nicht von denen mit HFrEF. Die Morbidität, basierend auf der 1-Jahres- Hospitalisierungsrate von bis zu 50%, ist in Bezug auf die Anzahl der Krankenhausaufenthalte bei systolischer und diastolischer Herzinsuffizienz vergleichbar. Das bedeutet, dass die Hospitalisierung von Patienten mit Herzinsuffizienz zur Hälfte auf eine diastolischen Herzinsuffizienz zurückgeht [9]. Die 1-Jahres- Mortalität beträgt ca. 30%, die 5-Jahres- Mortalität zwischen 65 und 68%. Dies belegt, dass die diastolische Herzinsuffizienz eine ähnlich ungünstige Prognose wie die der systolischen Herzinsuffizienz aufweist.

Zudem konnte gezeigt werden, dass sich die Überlebensrate von Patienten mit reduzierter Ejektionsfraktion im Laufe der Zeit erhöht, wohingegen dieser Trend bei Patienten mit HFpEF nicht zu beobachten ist. Die steigende Prävalenz der HFpEF, die stagnierende Mortalitätsrate sowie die bis dato fehlenden kurativen Therapieansätze verschärfen die Notwendigkeit gezielter Anstrengungen zur Lösung dieses Problems [102].

Den Großteil der Patienten mit diastolischer Herzinsuffizienz stellen ältere Frauen mit Hypertonie in der Vorgeschichte dar. Hauptrisikofaktor für die Entwicklung der DHF ist somit die arterielle Hypertonie [87], die bei über 80% der DHF- Patienten vorliegt [102,113]. Im Rahmen der Hypertonie sind meistens auch die linksventrikuläre und arterielle Steifheit abnormal erhöht [13]. Zusätzliche Risikofaktoren sind Diabetes mellitus, metabolisches Syndrom, koronare Herzerkrankung, Niereninsuffizienz, körperliche Inaktivität und Schlafapnoesyndrom.

Patienten mit DHF sind im Vergleich zum Patientenkollektiv mit reduzierter systolischer Auswurffraktion oftmals älter, weiblich, und haben weniger häufig koronare Herzerkrankung in der Vorgeschichte [37,113]. Aufgrund der verstärkten Sensibilisierung auf der einen, und erhöhten Komorbiditäten und wenig neuen Therapieansätzen auf der anderen Seite werden Prävalenz und Inzidenz der HF-PEF noch weiter steigen [31]. Auch im Hinblick auf den demographischen Wandel und die Zunahme der Lifestyle- und Alters-assoziierten Komorbiditäten wird die Prävalenz der DHF noch weiter steigen wird [58].

Bis jetzt liegt kein Therapieansatz vor, der die Morbidität und Mortalität von Patienten mit HF-PEF überzeugend zu reduzieren vermochte [68].

#### 1.2 Pathophysiologie der diastolischen Herzinsuffizienz

Die diastolische Herzinsuffizienz ist ein komplexes Syndrom, sodass ein multifaktorieller Ansatz die Pathophysiologie am besten beschreiben kann [30].

Die optimale linksventrikuläre Performance wird durch zwei Eigenschaften des Herzens bedingt, erstens durch die Compliance des linken Ventrikels, sich während der Diastole auszudehnen und Volumen aufzunehmen, und zweitens durch eine steife Kammer, die während der Systole das Schlagvolumen wieder auswirft. Die Eigenschaften des linken Ventrikels werden dabei durch die Größe oder Volumen der Kammer, durch die Dicke und physikalischen Eigenschaften der Ventrikelwand und durch den Prozess der Relaxation bestimmt.

Zwei Mechanismen sind an der Entstehung der diastolischen Funktionsstörung beteiligt: eine gestörte Relaxation und eine erhöhte passive Steifheit mit verminderter Compliance. Die Folge sind eine verlängerte isovolumetrischen Relaxation, eine Verlangsamung der Füllungsphase und erhöhte diastolische Steifheit [60]. Der Ventrikel vermag es nicht mehr, bei gleichen Druckverhältnissen durch Relaxation passiv Blut aus dem Atrium aufzunehmen. Dadurch sinkt das Füllungsvolumen des linken Ventrikels in der Diastole. Stattdessen erhöht sich die Rigidität gegenüber dem aufzunehmenden Volumen der Systole, wodurch ein größerer diastolischer Druck aufgebaut werden muss [27,123]. Ab einem definierten linksventrikulären Volumen erhöht sich folglich im Vergleich zur normalen linksventrikulären Funktion der enddiastolische Druck.

Dieser Druck ergibt sich aus einer anfänglichen gesteigerten Kontraktion des linken Ventrikels, wandelt sich jedoch bei weiterer Progredienz der Erkrankung durch konsekutive Druckerhöhung im kleinen Kreislauf in eine "Pseudonormalisierung" der Verhältnisse um. Diese konsekutive Drucksteigerung geht mit einer konzentrischen linksventrikulären Hypertrophie einher [49].

Die linksventrikuläre Hypertrophie, eine infolge eines Adaptationsprozesses erhöhte myokardiale Masse bei relative Wanddicke, ist dabei vom Remodeling mit normalen Herzmasse und erhöhter Wanddicke, abzugrenzen. Die chronische Druckerhöhung mit konsekutiver Hypertrophie mündet in einer veränderten Zusammensetzung der extrazellulären Matrix unter Ausbildung von Fibrose. Die Fibroseentstehung führt zu einer beeinträchtigten Relaxation des linken Ventrikels mit erhöhter Rigidität und konsekutiver Verminderung der Ventrikelfüllung während der Diastole [28].

Die myokardiale Fibrose, die zu vermehrter myokardialer Steifigkeit und infolge dessen zu einer diastolischen Relaxationsstörung und damit Dysfunktion führt, ist somit ein bedeutender Bestandteil in der Pathophysiologie der DHF [3]. Ursächlich für diesen maladaptiven fortschreitenden Umbauprozess sind Veränderungen der ventrikulärenarteriellen Kopplung: eine erhöhte vaskuläre Steifheit durch vaskuläre Dysfunktion und eine gleichzeitig erhöhte Nachlast führen zur Erhöhung des Blutdrucks [11]. Dies mündet in einer Beeinträchtigung der Relaxationsphase. Der Blutdruck und konsekutiv der Druck während der diastolischen Füllungsphase erhöhen sich und tragen so zur Progredienz der diastolischen Dysfunktion bei. Die Gruppe um Paulus macht die perivaskuläre Inflammation im Rahmen multipler Komorbiditäten wie Adipositas, Diabetes, Hypertonie und chronische Nierenerkrankungen für die Entstehung der DHF verantwortlich. Dieser Ansatz wendet somit den Fokus von der Bedeutung der linksventrikulären Überlastung weg und rückt ihn auf die Rolle der perivaskuläre Inflammation in der Pathogenese der DHF [81].

Zusammenfassend tragen eine erhöhte myokardiale Masse, Veränderungen der extrazellulären Matrixeigenschaften und Beeinträchtigungen des aktiven Prozesses der Relaxation zur Entstehung der diastolischen Funktionsstörung bei [27].

#### 1.3 Zelluläre Mechanismen und Veränderungen im Rahmen der DHF

Die diastolische Herzinsuffizienz ist ein komplexes Krankheitsbild, das durch ein multifaktorielles Zusammenspiel der meist vorliegenden Komorbiditäten wie arterielle Hypertonie, Diabetes, Adipositas und chronische Niereninsuffizienz. Im Verlauf der Erkrankung verändern sich strukturelle und funktionelle kardiale Parameter aufgrund des meist chronisch vorliegenden Hypertonus [35,104]. Es resultieren linksventrikuläre myokardiale Fibrose, Ischämie, Gefäßrarifizierung sowie Hypertrophie, eine Beeinträchtigung von Endothelzellen und Kardiomyozyten. Tschöpe et al. untersuchten in ihrer Arbeit die Bedeutung der endothelialen Dysfunktion im Rahmen der Pathogenese der HFpEF, die durch ein komplexes Zusammenspiel zwischen Endothelzellen, Kardiomyozyten, Fibroblasten und der Aktivierung des RAA-Systems eine prominente Rolle in der Entstehung der HFpEF [105]. Paulus et al. zeigten in ihrer Studie die Bedeutung eines durch diese Komorbiditäten ausgelösten systemischen, proinflammatorischen Zustands auf, der zu einer mikrovaskulären Inflammation der endothelialen Zellen und damit zu einem konsekutivem kardialen Remodeling und Funktionsverlust führt [75].

Dieser systemische proinflammatorische Zustand und die konsekutive koronare mikrovaskuläre endotheliale Inflammation führen zu einer Reduktion der Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) für angrenzende Kardiomyozyten, von zyklischem Guanosin-Monophosphat (c-GMP) sowie der Aktivität der Proteinkinase G (PKG). Stickstoffmonoxid ist ein Radikal aus der Gruppe der Stickoxide und führt zu einer physiologischen Erweiterung der Blutgefäße. Eine Verminderung der Bioverfügbarkeit von NO geht mit einer Akkumulation reaktiver Sauerstoff Spezies (ROS) in der Gefäßwand und im Verlauf zur Entstehung der endothelialen Dysfunktion einher. Dieses Missverhältnis von NO und ROS wird durch die im Rahmen der Herzinsuffizienz entstehende reflektorische Aktivierung des neurohumeralen Systems getriggert [7].

Die systemische Inflammation, induziert durch die bei HFpEF bestehenden Korbiditäten, löst im koronaren mikrovasklulären Endothel eine Expressionssteigerung von Adhäsionsmolekülen (Vascular cell adhesion proteins (VCAMs), E-selektin) aus, die zur Aktivierung von Einwanderung zirkulierender Leukozyten führt. Es kommt zu einer Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, welche die endotheliale ROS-Produktion durch Aktivierung des multikomplexen Enzyms Nicotinamid adenin dinukleotid phosphat Oxidase (NOX) auslösen [85]. Die Verminderung der NO-Bioverfügbarkeit geht mit einer Verringerung der löslichen Guanylat Zyklase-Aktivität (sGC) einher, welche nach Aktivierung durch NO im Zytosol der Synthese von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) und dient und somit zur Vasodilatation beiträgt. Zudem wird die Aktivität der cGMP- abhängingen Proteinkinase G (PKG) reduziert, welche für die Phosphorylierung des Strukturfilaments Titin zuständig ist. Die Titinfilamente verankern die Myosinfilamente zwischen den Aktinfilamenten im Sarkomer, und dienen somit der Ruhespannung und Elastizität des Sarkomers.

In der Folge kommt es durch die verringerte PKG-Aktivität zu einer Hypophosphorylierung von Titin und damit zu einer erhöhten passiven Rückstellkraft (engl. " restoring force") und Steifheit, welche die konsekutive Hypertrophie der Kardiomyozyten und somit das linksventrikuläre Remodeling induzieren [53].

Darüber hinaus führt der NO-Mangel zu einem Übergang endothelialer zu mesenchymalen Zellen (EndMT), der über die Expression von VCAM-1 und E-selectin von Endothelzellen zur Adhäsion von Leukozyten und konsekutive Freisetzung von Wachstumsfaktoren zur Differenzierung endothelialer in Myofibroblasten führt. Im weiteren Verlauf führen die erhöhte Steifheit der Kardiomyozyten sowie die erhöhte Ablagerung von Kollagenen durch Myofibroblasten zur Entwicklung einer diastolischen Funktionsstörung (75).

Borlaug et al. führen zwei hauptverantwortliche Gründe an, die die myokardiale Steifigkeit bedingen: Veränderungen der EZM und der Kardiomyozyten [11]. Modifikationen hinsichtlich einer der beiden Parameter beeinflussen sich gegenseitig. Die Arbeitsgruppe unterscheidet dabei intrinsische und extrinsische Mechanismen, die eine Störung der diastolischen Funktion verursachen und somit zur Entwicklung einer DHF führen können: die intrinsischen Mechanismen spielen sich dabei innerhalb des Myokards ab und betreffen die Kardiomyozyten oder die Extrazelluläre Matrix. Hierbei können Veränderungen des Zytoskeletts, der Myofilamente oder des Energiehaushalts eine Rolle spielen. Weitere intrinsische Mechanismen gehen auf eine Modifikation des neurohumeralen Systems oder auf ein Ungleichgewicht der Calcium-Homöostase zurück. Die extrinsischen Mechanismen beziehen sich auf Prozesse außerhalb des Myokards wie Veränderungen des Perikards oder hämodynamische Veränderungen [115].

#### 1.3.1 Veränderungen der Strukturproteine

Neben Veränderungen der EZM, die die passive Herzmuskelspannung im Rahmen der diastolischen Herzinsuffizienz bedingen, spielen Veränderungen innerhalb der Kardiomyozyten ebenso eine prominente Rolle. Im Vergleich zu Kardiomyozyten von Patienten mit HFrEF sind die Kardiomyozyten bei DHF-Patienten größer und steifer und besitzen eine höhere passive Dehnungskraft (engl. "F passive upon stretch") [108]. Dabei verändern Kardiomyozyten ihre passive Steifheit größtenteils durch Veränderungen des gigantischen Myofilaments Titin, welches somit essentiell für die Viskoelastizität der Sarkomere ist. Titin kann die passive Steifheit über Isoform-Switching, Veränderungen des Phosphorylierungs-Status sowie über direkte oxidative Effekte modulieren [23].

Titin ist ein gigantisches elastisches Protein, das von den Kardiomyozyten in zwei Isoformen exprimiert wird: N2B als steifere, N2BA als elastischere Isoform. Die Gruppe um Van Heerebeek et al. konnte feststellen, dass die Expressionssteigerung der weniger dehnbaren Isoformen des Zytoskelettproteins Titin möglicherweise zur Entwicklung einer DHF beiträgt [108]. Die myokardiale Steifigkeit wird durch ein Verhältnis beider Formen bedingt und durch Phosphorylierung über den PKA/PKG Pfad reguliert [39]. Die bei HFpEF-Patienten bestehende Hyophosphorylierung von Titin, sowie die verminderte Protein-Kinase-G-Aktivität führen zur einer Herabsetzung der cGMP-Konzentration, die normalerweise die PKG aktiviert [22]. Dieser Zustand von verminderter cGMP-Konzentration und PKG-Aktivität ist laut Paulus und Tschöpe einer der letzten Schritte für die Entwicklung myokardialer Steifheit und Hypertrophie [81].

Hinsichtlich des zeitlichen Auftretens ist es wahrscheinlich, dass die durch Kardiomyozyten bedingten Veränderungen im Rahmen der Entstehung der DHF eher zu Beginn der Krankheit eine Rolle spielen, wohingegen Veränderungen des EZM-Metabolismus eher in fortgeschrittenen Stadien auftreten [23]. Titin trägt in elementarer Weise zum linksventrikulären passiven Druck bei normalem Volumen bei, wohingegen die EZM bei größeren Volumenveränderungen zum Tragen kommt [16].

In der Zusammenschau lässt sich konstatieren, dass das strukturelle Remodeling im Rahmen der DHF ein komplexes Zusammenspiel aus Veränderungen innerhalb der Kardiomyozyten und einer veränderten Zusammensetzung der EZM umfasst. So tragen Veränderungen der EZM, die durch eine verstärkte inflammatorische Antwort bedingt sind, in Form von quantitativen und qualitativen Veränderungen des Kollagenmetabolismus zur Fibroseentstehung und Steifheit des Myokards bei. Des Weiteren spielen posttranslationale Veränderungen des Sarkomerproteins Titin, eine verminderte Bioverfügbarkeit von Nitratoxiden und die Beeinträchtigung der cGMP/ PKG-Signalkasakde eine ebenso wichtige Rolle für die Entwicklung der diastolischen Dysfunktion und DHF [23,31].

#### 1.4 Zelluläre Grundlagen der kardialen Kontraktilität und Relaxation

Der Herzzyklus besteht aus Erregung und Kontraktion während der Systole und Relaxation während der Diastole. Dabei spielt die Calcium- Homöostase sowohl für Kontraktion als auch für die Relaxation eine entscheidende Rolle. Der Ca2+-Ionenabhängige Prozess von Erregung und resultierender mechanischer Arbeit wird als elektromechanische Kopplung bezeichnet. Die Koordination der aktiven Relaxation des Myokards beginnt mit der Wiederherstellung des Ca2+-Spiegels im Zytosol durch die Dissoziation der Calciumionen von dem Myofilament Troponin, wodurch die Myofilamente in ihre ursprüngliche Länge zurückkehren können. Zwei Mechanismen sind an der Reduktion des zytoplasmatischen Calciums in den Kardiomyozyten beteiligt: die SR-Ca2+-ATPase (SERCA2a) befördert zu ca. 70% Calcium aus dem Zytoplasma ins Sarkoplasmatische Retikulum (SR). 28% des Calciums werden durch den spannungsabhängige Na+-Ca2+-Kanal entfernt, und das verbleibende Calcium verschwindet durch Wiederaufnahme in das Mitochondrium oder durch Elimination durch eine membran-gebundene Ca2+-ATPase [28,36]. Die Aktivität der SERCA2a wird durch die Phosphorylierung ihres Gegenspieler- Proteins Phospolamban (PLB) reguliert. Im phosphorylierten Zustand aktiviert Phospholamban die SERCA2a und reduziert somit den Calcium- Spiegel im Zytosol. Der nicht-phophorylierte Zustand von PLB hemmt die SERCA2a-Aktivität und beeinflusst über Verstärkung ß-adrenergen der Rezeptorstimulation die Relaxation des Myokards. Die Aktivität von Phospholamban wiederum wird durch die Calcium Calmodulin Kinase II (CaMKII) reguliert [28,110]. Eine Untersuchung der Genexpression von regulatorischen Proteinen der Calcium-Homöostase konnte zeigen, dass bei Patienten mit DHF ein inverser Zusammenhang zwischen Expression der SERCA2a und der isovolumetrischen Relaxationszeit (IVRT) besteht, welche maßgeblich zur Pathophysiologie der linksventrikulären diastolischen Füllung beiträgt. Eine beeinträchtigte Wiederaufnahme des zytosolischen Calciums ins SR aufgrund einer verminderten SERCA2a-Expression führt zu einer Relaxationsstörung [97]. Im diabetischen Tiermodell mit diastolischer Funktionsstörung wurde untersucht, dass das Enzym SERCA2a vermindert exprimiert wird [84].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Veränderungen der cytosolischen Calcium-Konzentration im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen auftreten, und diese sowohl die aktiven als auch passiven Relaxationsvorgänge pathologisch beeinflussen können.

#### 1.5 Myokardiales Remodeling- Veränderungen der myokardialen Steifigkeit

Das klinische Outcome von Patienten mit Herzinsuffizienz ist stark vom Ausmaß des ventrikulären Remodeling abhängig. Kardiales Remodeling umfasst diverse pathologische Prozesse im Herzen, die sich aufgrund von in- oder extrinsischem Stress auf zellulärer und molekularer Ebene abspielen, und zu strukturellen und funktionellen Veränderungen führen [86]. Therapieansätze, die sich auf die Reduktion der pathologischen Prozesse des kardialen Remodeling richten, gehen mit verminderter Mortalität und Morbidität einher [20].

Die diastolische Funktionsstörung basiert auf einer veränderten myokardialen Steifigkeit, die Einfluss auf Compliance und Dehnungsverhalten des Ventrikels während der Diastole nimmt. Patienten mit diastolischer Dysfunktion weisen im Myokard einen erhöhten interstitiellen Kollagengehalt sowie erhöhte Steifheit und Hypertrophie der Kardiomyozyten auf [108]. Eine Folge ist eine strukturelle und mechanische Veränderung des moykardialen Gewebes, die auch als myokardiales Remodeling bezeichnet wird [46,118].

Im Folgenden wird explizit auf zwei Aspekte des kardialen Remodeling eingegangen: der erste Teil geht auf das strukturelle Remodeling ein, welches Veränderungen der EZM und die verursachenden Faktoren sowie Veränderungen innerhalb der Kardiomyozyten umfasst. Anschließend wird auf den Zusammenhang von myokardialem Remodeling und Enzündung in der Pathogenese der diastolischen Herzinsuffizienz verwiesen.

Im zweiten Teil wird das elektromechanische Remodeling näher erläutert, das Veränderungen der elektromechanischen Kopplung und die konsekutive Beeinflussung der Kontraktionsabläufe der Kardiomyozyten beschreibt.

#### 1.5.1 Strukturelles Remodeling: Veränderungen der extrazellulären Matrix

Die passive Herzmuskelspannung wird durch die Beschaffenheit zweier Einflussgrößen bedingt: die der Extrazellulären Matrix und die der Kardiomyozyten [12]. Die Zusammensetzung der EZM wird hauptsächlich vom Kollagenumsatz und die der Kardiomyozyten durch das elastische Strukturprotein Titin bestimmt. Die EZM besteht größtenteils aus einem Kollagennetzwerk, welches den Kardiomyozyten strukturelle Unterstützung in der Generierung von Kraft und passiver Steifheit bietet. Im Rahmen der Herzinsuffizienz kommt es zu einem extensiven Verlust funktionaler Kardiomyozyten, die nicht mehr die kardiale Kontraktion und Funktion aufrechterhalten können. Myokard wird durch Narbengewebe von proliferierenden kardialen Fibroblasten ersetzt.

Im normalen myokardialen Bindegewebe, das sich hauptsächlich aus Kollagen-I und Kollagen-III-Fasern zusammensetzt, herrscht ein Gleichgewicht zwischen elastischen und weniger elastischen Kollagenfasern. Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen Progredienz der HFpEF und einem gesteigerten Kollagenumsatz [64]. Jedoch ist für die Entstehung der Fibrose nicht die rein quantitative Zunahme von Kollagenfasern, also Fasergeometrie, Grad der Quervernetzung und das Verhältnis der Isotypen I zu III [12]. Es liegt ein fein austariertes Gleichgewicht zwischen Kollagen- abbauenden Enzymen der Familie der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und ihren spezifischen Inhibitoren (TIMP, Tissue Inhibitor of Metalloproteinases) vor. Die Alternation dieses Gleichgewichts führt zu einer veränderten Zusammensetzung der EZM und damit zu einer Veränderung struktureller und funktioneller kardialer Parameter. So konnte in aktuellen klinischen Studiendaten gezeigt werden, dass das Auftreten der diastolischen Herzinsuffizienz mit dem Anstieg serologischen Marker des Matrixumsatzes korreliert, die repräsentativ für aktuellen Kollagenstoffmetabolismus und somit Fibrosegrad sind.

In einer Studien an hypertensiven Patienten zeigte sich, dass das kardiale Remodeling mit signifikanten Veränderungen des Matrixumsatzes assoziiert ist [3]. So ist ein erhöhter Plasmaspiegel an TIMP-1 mit einer verstärkten Inhibition der MMPs und damit einer Verminderung des Kollagenabbaus assoziiert. MMP-2 ist ein sehr spezifischer Marker für die Diagnose der DHF [65]. Borlaug konnte diesbezüglich demonstrieren, dass bei hypertensiven Patienten mit HFpEF ein verminderter Matrixumsatz vorliegt, der durch eine Down-Regulation der MMPs und eine Hochregulierung der TIMPs zustande kommt [12].

#### **1.5.2** Myokardiales Remodeling und Inflammation

Im Zuge der chronischen Druckerhöhung bei HFpEF kommt es zur Einwanderung von inflammatorischen Zellen, insbesondere Monozyten, die über die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und pro-fibrotischer Faktoren zum fibrotischen Prozess beitragen [43]. Die Expressions- und Produktionssteigerung proinflammatorischer Entzündungsmediatoren beeinflusst die Zusammensetzung der EZM durch regulatorische Kontrolle der Biosynthese und Degradation von Kollagen.

Das Remodeling ist somit Folge eines langwährenden Entzündungsprozesses, der durch Expressions- und Produktionssteigerung proinflammatorischer Entzündungsmediatoren im fibrotischen Umbau des Myokards mündet. Somit stellt die Inflammation einen wichtiger Auslöser für die Entstehung kardialer Fibrose mit konsekutiver Akkumulation von Kollagenen dar [116], und spielt eine prominente Rolle in der Entstehung der HFpEF. Zu diesem Ergebnis kamen auch Zile et al, die zeigen konnten, dass die Entwicklung Kollagen-bedingter Veränderungen im Rahmen der diastolischen Dysfunktion eng an proinflammatorische und profibrotische Stimuli gekoppelt sind [127].

Der myokardiale Kollagenumsatz wird über eine gesteigerte Degradation der TIMPs durch das Renin-Aldosteron-Angiotensin-System (RAAS) und den Wachstumsfaktor TGF-ß reguliert. Inflammatorische Zellen exprimieren wachstumsfördernde Zytokine TGFs (Transforming Growth Factors), die die kardialen Fibroblasten direkt beeinflussen und über die Interaktion mit den MMPs und TIMPs den Kollagenumsatz regulieren [116]. Durch Expression von TGF differenzieren sich die kardialen Fibroblasten in Myofibroblasten und tragen damit erheblich zum pathologischen Prozess des myokardialen Remodeling bei. Dies geschieht über die Fähigkeit der Myofibroblasten, selbst Kollagen zu produzieren, und darüber hinaus inflammatorische Zytokine wie Interleukin -6, -8 oder das chemotaktische Monozyten Protein-1 (MCP-1) zu sezernieren [28]. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass nekrotische Kardiomyozyten molekulare Gefahren- oder Schadsignale, sogenannte Damage associated molekular patters (DAMPs), freisetzen, die in vitro zur Aktivierung von Fibroblasten und in vivo zu myokardialer Inflammation und Fibrose führen [120].

In Tiermodellen der chronischen Drucküberbelastung und der HFpeEF konnte demonstriert werden, dass in den frühen und späten Phasen der Herzinsuffizienz die Einwanderung von Monozyten/ Makrophagen in das geschädigte Myokard eng mit verstärkter Inflammation, Gewebsschädigung und der Entstehung von Fibrose verknüpft ist [32]. Makrophagen lassen sich in die klassischen, proinflammatorischen M1-Makrophagen, die in der Phase der akuten Gewebsschädigung, Entzündung und Phagozytose eine zentrale Rolle spielen, und in die alternativen, anti-inflammatorischen M2-Makrophagen einteilen, die sowohl das Inflammationsgeschehen als auch die adaptiven, fibrotischen Umbauprozesse des Gewebes bedingen [25]. Die verstärkte periphere Entzündung, Monozytose und Differenzierung von Monozyten zu antientzündlichen/profibrotischen M2-Makrophagen ist eng mit der HFpEF sowie der ihr vorausgehenden asymptomatischen LVDD (asymptomatic LV Diastolic Dysfunction) Phase verbunden. Über ein hochkomplexes Zusammenspiel der Zell-Interaktionen von Monozyten/Makrophagen, Plättchen, Endothelzellen in Blutgefäßen, Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten beeinflussen Monozyten die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen und spielen sowohl hinsichtlich des kardialen Inflammationsgeschehens als auch der Fibroseentstehung eine essenziele Rolle in der Pathogenese der HFpEF.

Neben der im Zuge der systemischen Inflammation bedingten Sekretion klassischer inflammatorischer Proteine wie TNF- $\alpha$  und IL-6 spielen tragen weitere inflammatorische Signalkaskaden zu der Entstehung des myokardialen Remodeling bei.

Das Protein Lactoferrin (LTF) ist ein multifunktionales Protein aus der Eisen-bindenden Transferrin-Gruppe und durch seine antimikrobielle Wirkung Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Erste Studien weisen darauf hin, dass eine erhöhte Lactoferrin- Konzentration im Serum das Langzeitrisiko für das Auftreten ischämischer Herzerkrankung bei Patientin mit Erstdiagnose Diabetes vorhersagen könnte [111].

Auch das Protein Cathelicidin (CAMP, LL-37), ein antimikrobielles multifunktionelles Polypeptid, ist Teil des angeborenen Immunsystems, wird von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen sezerniert und wirkt neben seiner antimikrobiellen Funktion chemotaktisch für Monozyten, T-Zellen und Mastzellen.

Die Arbeitsgruppe um Kumagi et al. konnte zeigten, dass die Cathelicidin-Expression im Herzen während der Entzündungsund Erholungsphase in einem Autoimmunmyokarditis-Modell signifikant erhöht war. Die Folgen dieser erhöhten CAMP-Expression waren die Aktivierung der purinergen P2X7-Rezeptorkaskade und eine konsekutive Verminderung kardialer Fibroblasten. Durch die Behandlung mit CAMP wurden in den Fibroblasten, aber nicht in Kardiomyozyten MAP-Kinasen aktiviert, was über weitere Signalkaskaden zur verminderten Einwanderung von Fibroblasten in das Myokard führte. Fibroblasten sind einer der häufigsten Vertreter der Nicht-Kardiomyozyten im Myokard, und ihre Einwanderung ist eng an die

Fibroseentstehung gekoppelt [55]. Allerdings spielt auch in der Immunantwort im Rahmen der Entwicklung der HFpEF der Zeitfaktor eine große Rolle: in der frühen Phase der akuten diastolischen Dysfunktion dominierte die proinflammatorische M1-Antwort und Aktivierung inflammatorischer Zellen, in der fortgeschrittenen HFpEF kommt es eher zur Aktivierung anti-inflammatorischer/ profibrotischer M2-Antwort [25,43]. So konnte anhand menschlicher endomyokardialer Biopsien demonstriert werden, dass eine verstärkte kardiale Inflammation zum extrazellulären Matrix Remodeling und damit zur Entwicklung einer diastolischen Funktionsstörung in der HFpEF beiträgt [116]. Die folgende Abbildung dient der Veranschaulichung und Zusammenfassung des EZM-Metabolismus und seiner Rolle für die Entstehung kardialen Remodeling im Rahmen der

Pathogenese der HFpEF/ DHF (Abbildung 1.1).



Abbildung 1.1: Schaubild der an der Pathogenese der diastolischen Funktionsstörung beteiligten Akteure. Komorbiditäten wie Hypertonie, Adipositas und Diabetes mellitus induzieren einen systemischen inflammatorischen Zustand, der über Einwanderung und Adhäsion von inflammatorischen Zellen (Monozyten/ Makrophagen, neutrophile Granulozyten) zur verstärkten Sekretion proinflammatorischer Zytokine führt. Die resultierende endotheliale Dysfunktion geht im weiteren Verlauf mit einer erhöhten Rückstellkraft und Steifheit der Kardiomyozyten einher.

Zudem kommt es durch die Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen durch Beeinflussung des Kollagenmetabolismus zu einer veränderten Zusammensetzung der EZM und im weiteren Verlauf zur Entstehung kardialer Fibrose. Dies verändert die elektromechanische Kopplung innerhalb der Kardiomyozyten. Dieses sich gegenseitig beeinflussende Zusammenspiel innerhalb der EZM führt im weiteren Verlauf zur Entstehung des kardialen Remodeling und der konsekutiven diastolischen Funktionsstörung.

In der Zusammenschau zeigen diverse Studien, dass der inflammatorische Prozess im Kontext vieler kardiovaskulärer Erkrankungen eine prominente Rolle spielt, da er eng an die Entstehung kardialen Remodeling gekoppelt ist.

Die Akkumulation von Kollagen im extrazellulären Raum, die Einwanderung inflammatorischer Zellen und der konsekutive Umbauprozess des Myokards spielen somit in der Pathogenese der diastolischen Herzinsuffizienz eine herausragende Rolle.

#### 1.5.3 Elektromechanisches Remodeling

Die Herzinsuffizienz geht mit anatomischen, mechanischen und funktionalen Veränderungen des Myokards einher, die auch die kardiale Elektrophysiologie beeinflussen. Eine Störung der elektrophysiologischen Kopplung der Kardiomyozyten erhöht das Risiko der Entstehung maligner ventrikulärer Tachyarrhythmien und damit des plötzlichen Herztods (Sudden Cardiac Death, SCD). Bei Patienten mit Herzinsuffizienz trägt der plötzliche Herztod aufgrund ventrikulärer Tachyarrhythmien zu 50 % der Mortalität bei [5] und ist damit von enormer klinischer Relevanz. Strukturelles Remodeling des linken Atriums geht mit elektrischem Remodeling einher und prädispositioniert DHF-Patienten für Vorhofflimmern [119]. Somit korreliert elektrisches Remodeling und die damit verbundene molekulare Veränderungen mit strukturellem und funktionalem Remodeling und ist von großer Wichtigkeit in der Entstehung der Herzinsuffizienz [72]. Dieses Remodeling beruht maßgeblich auf einer reduzierten Dichte, Verteilung und posttranslationalen Modifikation des wichtigsten Gap Junction - Proteins im Myokard, dem Protein Connexin-43 [4].

Die Glanzstreifen (Disci intercalares) sind für die mechanische und elektrische Kopplung der Kardiomyozyten unerlässlich. Sie bestehen aus drei strukturell und funktionell verschiedenen Untereinheiten: der Fascia adherens, den Desmosomen und den Gap Junctions. Gap Junctions sind hochkomplexe intrazelluläre Ionenkanäle, die für die Zell-Zell Kommunikation und Synchronisation verantwortlich sind [86].

Sie ermöglichen durch geringen elektrischen Widerstand die Kopplung zwischen den Kardiomyozyten und dadurch den Austausch von Ionen und kleinen Molekülen zwischen den Zellen [18]. Die Gap Junctions bestehen aus zwei gekoppelten Hemikanälen, die aus sechs Connexin- Untereinheiten bestehen. Im Myokard und Gefäßsystem werden fünf

verschiedene Connexine exprimiert, wobei Connexin-43 im Myokard am häufigsten exprimiert wird. Connexin-43 ist für die elektrische Reizweiterleitung zwischen den einzelnen Kardiomyozyten und damit für normale elektrische Aktivierung und anschließende Kontraktion maßgebend verantwortlich.

Eine Veränderung des Connexin-Gehalts geht mit einer gestörten elektromechanischen Kopplung der Kardiomyozyten und somit einer Anfälligkeit des Myokards für Arrhythmien einher. Dupont und seine Kollegen konnten zeigen, dass bei chronischer Herzinsuffizienz der Connexin-43 –Gehalt sowohl auf mRNA –Ebene als auch auf Proteinebene vermindert ist [19]. Diese Beobachtungen machen deutlich, dass Therapieansätze zur Verhinderung oder Reduktion der Entstehung von elektrischen Remodeling von großem wissenschaftlichem Interesse sind.

### 1.6 Pathophysiologische Bedeutung von Angiotensin II für die Entwicklung der diastolischen Herzinsuffizienz

Die arterielle Hypertonie stellt den häufigsten kardiovaskulären Risikofaktor bei Patienten mit HFpEF dar, und weist eine Prävalenz von 55-84% auf [58], weswegen sich das RAAS als offensichtlicher Angriffspunkt therapeutischer Strategien zur Behandlung der HFpEF etabliert hat [68].

Im Rahmen der Herzinsuffizienz werden zwei neurohumerale Schlüssel-Hormonsysteme aktiviert, das RAAS und das Sympathische-Nerven-System. Die Aktivierung dieser Systeme führt zu einer Steigerung des zentralen und systemischen Flüssigkeitsvolumens. In der Folge steigt der Lungenkapillarenverschlussdruck (PCWP). Systemische Mechanorezeptoren messen eine relativ zu geringe arterielle Füllung, sodass im Rahmen der homöostatischen Antwort neurohumerale Systeme aktiviert werden. Die Hypertonie führt zu einer Steigerung von Füllungsvolumen und enddiastolischem Druck. Das Myokard reagiert auf diese veränderte Arbeitsbelastung mit linksventrikulärer Hypertrophie (LVH), die wiederum eine Steigerung des Gefäßwiderstandes und Nachlast erhöhten Sauerstoffverbrauch verursacht. Die und damit Folgen dieser Beeinträchtigungen münden im strukturellen Umbau des Myokards, der die Entwicklung der Herzinsuffizienz begünstigt [112]. Die Aktivierung des RAA-Systems trägt zudem zur Progredienz des kardialen Remodeling noch bei, indem es die Entwicklung der myokardialen Fibrose begünstigt [73].

Das Hormon Angiotensin II (AT II) besitzt eine physiologische direkte Wirkung auf das Myokard, indem es bei verminderter Kontraktilität die linksventrikuläre Wandspannung erhöht [124]. Zudem beeinflusst es kardiale Funktionsparameter durch seine direkte Interaktion mit dem Kollagenstoffwechsel über Stimulation der myokardialen Kollagensynthese sowie des Kollagenabbaus durch Abschwächung der Aktivität der MMPs [50]. AT II führt zur Stimulation der Produktion von TGF-ß in kardialen Fibroblasten und wirkt somit auf den Kollagenmetabolismus innerhalb der EZM ein [90]. Hinsichtlich der Therapie der Herzinsuffizienz steht die medikamentöse Hemmung des RAAS (z.B. via ACE-Hemmer, AT II-Blocker) in der Therapie der Herzinsuffizienz an vorderster Stelle [68]. Die medikamentöse Hemmung des RAA-Systems verhindert nicht nur die Entstehung von myokardialem Remodeling, das sowohl mit HF-rEF als auch mit HF-pEF und ihren Vorläuferstadien assoziiert ist, sondern verbessert auch das Outcome von Patienten mit HF-rEF [61]. Die Blockade des Angiotensin-I-Rezeptors in Myozyten reduziert die Hypertrophie und myokardiale Fibrose in hypertrophen hypertensiven Herzen [103]. Zu selbigem Ergebnis kommt Zile, der den Zusammenhang zwischen kardialer Hypertrophie durch Angiotensin II und Hypertonie untersuchte [123].

Die Hypertrophie der einzelnen Kardiomyozyten wird durch interstitielle und perivaskuläre Fibrose sowie endotheliale Veränderungen der intramyokardialen Koronararterien begleitet [43]. AT II führt zur Hypertrophie der Kardiomyozyten und verstärkt die Proliferation kardialer Fibroblasten und damit die Synthese von Kollagen [101]. Somit ist linksventrikuläre Hypertrophie eine Folge von chronischer Drucksteigerung und einer der wichtigsten Risikofaktoren bei hypertensiven Patienten. Daraus folgt ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Vorhofflimmern, diastolischer und systolischer Herzinsuffizienz und plötzlichem Herztod [48].

Allen Erkenntnissen zum Trotz lässt die Mortalität und Morbidität von Patienten mit HFpEF durch den Einsatz von ACE-Hemmern und ATII-Rezeptorblockern zwar senken, das Ausmaß der kardialen Fibrose wird jedoch nicht beeinflusst. Die soeben geschilderten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Entstehung kardialer Fibrose eng an einen veränderten Matrixumsatz gekoppelt ist. Zudem wird ersichtlich, dass die Zunahme kardialer Fibrose einen essentiellen Faktor in der Pathogenese der diastolischen Dysfunktion darstellt. Daraus lässt sich schließen, dass die Regulation, wenn nicht sogar die Reduktion des überschießenden EZM- Umsatzes ein außerordentlich bedeutendes Therapieziel wäre.

Zusammenfassend ist die Pathogenese der diastolischen Funktionsstörung multifaktoriell bedingt. Sowohl intra- als auch extrakardiale Veränderungen können zur Entwicklung einer DHF führen. Der Mangel an effektiven Therapieansätzen könnte auf eben jener Heterogenität der Ursachen beruhen.

#### 1.7 Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF)

G-CSF ist ein 25kDa großes Glykoprotein und Zytokin, das hauptsächlich von hämatopoetischer Zellen wie Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten produziert wird. G-CSF reguliert Proliferation, Differenzierung, Reifung und Überlebensrate myeloischer Vorläuferzellen und spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation und Produktion von Neutrophilen Granulozyten im Rahmen der Immunantwort und Infektbekämpfung. Darüber hinaus beeinflusst G-CSF in der Hämatopoese die Mobilisierung von Granulozyten, Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in die Blutzirkulation [47,117]. G-CSF moduliert die Funktion Neutrophiler Granulozyten, in dem es sowohl biologische Effekte wie die Phagozytose-Aktivität oder Antikörpervermittelte Toxizität erhöht, als auch die inflammatorische Immunantwort moduliert. Diese biologischen Effekte werden über die Bindung an den G-CSF-Rezeptor ausgeübt, der vorwiegend auf Neutrophilen Granulozyten sowie Vorläuferzellen, aber auch auf Monozyten und Endothelzellen exprimiert wird [65]. Stimuliert wird die G-CSF-Sekretion bei physiologischem oder pathologischem Stress durch immunmodulatorische Mediatoren wie TNF- $\alpha$ , IL-1, Il-17, Interferon- $\gamma$  und Lipopolysaccharide [52].

Klinisch wird G-CSF eingesetzt, um die durch Chemotherapie assoziierte Neutropenie im Rahmen maligner Tumorerkrankungen zu behandeln. So führt die Behandlung mit G-CSF durch eine Steigerung der Anzahl zirkulierender hämatopoetischer Stammzellen nicht nur zu einer beschleunigten Regeneration der Neutrophilenanzahl nach Chemotherapie und wird daher im Rahmen autologer/allogener Transplantationen genutzt, sondern vermindert auch die Inzidenz von Entzündungen der Mukosa, des Auftretens von Fieber und der Notwendigkeit des Einsatzes von Antibiotika [77].

#### 1.7.1 G-CSF im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen

Neben seiner immunmodulatorischen Funktion übt G-CSF einen positiven Effekt auf myokardiales Remodeling und myokardiale Funktionsparameter im Rahmen zahlreicher kardiovaskulärer Erkrankungen wie Myokardinfarkt und Dilatative Kardiomyopathie (DCM) aus [35,100]. Auch bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz aufgrund von Ischämie oder DCM ist ein positiver Effekt durch den Einsatz von G-CSF zu beobachten [40]. Aktuell wird der therapeutische Einsatz von G-CSF nach Myokardinfarkt (MI) untersucht, da G-CSF eine direkte Wirkung auf Kardiomyozyten ausübt. So wirkt G-CSF sowohl über Zell-abhängige als auch Zell-unabhängige Prozesse auf das ischämische Myokard ein. Dies geschieht einerseits über die Mobilisierung von Stammzellen ins periphere Blut, andererseits durch eine direkte Beeinflussung geschädigter Kardiomyozyten [2]. Harada et al. konnten zeigen, dass die Behandlung mit G-CSF nach akutem Myokardinfarkt zu einer verringerten Apoptoserate der Kardiomyozyten und vermehrten Ausschüttung anti-apoptotischer Proteine führt und damit zur Verbesserung kardialer Funktionen, beziehungsweise zu einer positiven Beeinflussung des Infarkt-Remodeling. In kultivierten Kardiomyozyten wird der G-CSF-Rezeptor von Kardiomyozyten und Fibroblasten exprimiert und durch den Einsatz von G-CSF über den Signalweg Jak/STAT aktiviert [35].

Weiter Studien bestätigen die Annahme, dass sich die Gabe von G-CSF über die Mobilisierung und Differenzierung von Stammzellen des Knochenmarks positiv auf die Regeneration von Kardiomyozyten und Blutgefäßen in Postinfarkt- Patienteneinen auswirkt [76,91]. Andere Studien hinterfragen jedoch die Hypothese, dass die G-CSF– Gabe eine Differenzierung hämatopoetischer Zellen in myokardiale Zellen induziert [26]. Der Einsatz von G-CSF bei Patienten mit akutem MI verbessert nicht die linksventrikuläre Funktion, jedoch profitieren Patienten mit beeinträchtigter linksventrikuläre EF von frühzeitiger G-CSF-Gabe [1]. Im Gegensatz dazu steht die Studie von Takano et al., die zeigen konnten, dass sich die G-CSF-Gabe nach MI positiv auf das myokardiale Remodeling auswirkt und über eine Verbesserung funktioneller Parameter (Ejektionsfraktion, endsystolischem und enddiastolischem Durchmesser, LV Druck) die Mortalität senken konnte [101]. Konsistent zu dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass G-CSF zu einer Verringerung von linksventrikulärem Remodeling und konsekutiver Dysfunktion führt, indem G-CSF regulierend in die Phagozytose von nekrotischem Gewebe, auf die Proliferation von Fibroblasten und die Angiogenese durch mobilisierte Leukozyten wirkt [70]. Zu ähnlichem Ergebnis kommt die Gruppe um Yiwen Li, der zeigen konnte, dass G-CSF durch Reduktion der kardialen Fibrose die kardiale Funktion verbessert [117] und im Rahmen von Angiotensin-II-induzierter kardialer Hypertrophie einen positiven Effekt auf myokardiales Remodeling aufweist [42].

#### 1.7.2 G-CSF und Inflammation

Neben seiner Wirkung auf die Proliferation und Differenzierung von neutrophilen Granulozyten besitzt G-CSF eine essenzielle immunregulatorische Funktion. Inflammation stellt eine der ersten Antworten des Organismus auf kardialen Stress wie Druck- und Volumenerhöhung dar. So kommt es im Rahmen chronischer Herzinsuffizienz zur Aktivierung zahlreicher inflammatorischer Prozesse, die mit der Ausschüttung pro-inflammatorischer Zyokine wie TNF- $\alpha$ , IL-6,-IL-8 einhergehen [94]. Die Behandlung mit G-CSF schwächt die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-1b, IF- $\gamma$  ex vivo im Blutbild ab [10]. Verantwortlich für die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine sind neutrophile Granulozyten, Monozyten, Endothelzellen und Makrophagen [31].

Wie bereits beschrieben, tragen inflammatorische Prozesse in bedeutender Weise zur Progredienz der HF-pEF bei [92]. Szardien et al. konnten in einem linksventrikulären Hypertrophiemodell durch Transversale Aortenkonstriktion (TAC) zeigen, dass der Einsatz von G-CSF zur signifikanten Rückbildung der kardialen Hypertrophie und Fibrose und damit zu einer relevanten Verbesserung kardialer Funktionsparameter führt. Diese Funktionsverbesserung im Tiermodell lässt sich durch die G-CSF vermittelte Mobilisierung von Neutrophilen Granulozyten ins Myokard erklären. G-CSF induziert in den Neutrophilen eine selektive Expressionssteigerung von Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), das die Aktivität und Expression der Matrixmetalloproteinasen in kardialen Fibroblasten steigert. Diese Expressionssteigerung von MMP-2 und MMP-9 ist für den raschen Kollagenabbau und die damit erklärbare konsekutive Normalisierung der kardialen Parameter verantwortlich [100].

#### 1.8 Projektbeschreibung

Eine Herzinsuffizienz mit normaler/ erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF) liegt bei etwa der Hälfte der Patienten mit Herzinsuffizienz vor [68], und ist daher weltweit für den öffentlichen Gesundheitssektor von besonderer Bedeutung [51]. Im Gegensatz zur systolischen Herzinsuffizienz hat sich das Endergebnis von Patienten mit HFpEF aufgrund eines weiterhin bestehenden Mangels an effektiven Therapieoptionen bisher nicht verbessert [9,81]. Da die HFpEF für ein komplexes und sehr heterogenes Erkrankungsbild steht, sind kurative Therapieansätze bis heute Gegenstand intensiver medizinischer Forschung [109].

Ein typischer Risikofaktor für die Entwicklung einer diastolischen Funktionsstörung ist die linksventrikuläre Hypertrophie aufgrund langjähriger arterieller Hypertonie [6], [31]. Die sehr komplexe Pathophysiologie beinhaltet sowohl eine gestörte linksventrikuläre Relaxation und kontraktile Reserve, erhöhte linksventrikuläre Steifheit, als auch ein gestörter renalen Natrium-Haushalt, arterielle Steifheit und eine abnorme ventrikuläre elektromechanische Kopplung. Durch strukturelles und funktionelles Remodeling kommt es zu einer gestörten Relaxation und verminderten Compliance des Ventrikels. Kardiales Remodeling ist die Folge eines langwährenden Entzündungsprozesses, der zur Expressions- und Aktivitätssteigerung proinflammatorischer Entzündungsmediatoren führt. Dies führt zur Veränderung der EZM sowie zur Beeinträchtigung der regulatorischen Kontrolle der Biosynthese und Degradation von Kollagen. Hierbei ist besonders die Zunahme der kardialen Fibrose zu erwähnen [31].

Bislang gibt es diesbezüglich nur wenige spezifische Therapieansätze.

Die Grundlage des experimentellen Ansatzes zur Überprüfung unserer Hypothese bildet die Arbeit von Sebastian Szardien et al., die in einem linksventrikulären Hypertrophiemodell zeigen konnten, dass die Behandlung mit G-CSF zu einer Regression von Hypertrophie und Fibrose führt. Die Mechanismen beruhen auf einer inflammatorischen Reaktion, bei der selektiv IL-1β ausgeschüttet wird, welches in kardialen Fibroblasten zu einer verstärkten Expression und Aktivität von Matrixmetalloproteinasen führt und dadurch den Abbau von Kollagenen erhöht.

In der Zellkultur konnte durch Stimulation von Neutrophilen Granulozyten gezeigt werden, dass die Expression von IL-1 $\beta$  direkt durch G-CSF vermittelt wird [100].

Die im Nachfolgenden vorgestellte experimentelle Arbeit soll zeigen, ob sich eine Behandlung mit G-CSF positiv auf das myokardiale Remodeling bei diastolischer Funktionsstörung auswirkt. Um diese Frage zu beantworten, wird anhand eines Tiermodells an der Maus durch eine kontinuierliche Angiotensin II-Applikation über eine osmotische Pumpe eine isolierte diastolische Dysfunktion induziert.

Tiermodelle der diastolischen Funktionsstörung, die nicht auf Druck- oder Volumenüberlastung basieren, sind rar, und beschränken das Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen sowie der Entwicklung neuer Therapieansätze. Basierend auf vier Versuchsgruppen wird nachfolgend untersucht, inwiefern sich eine Behandlung mit G-CSF positiv auf kardiale morphologische und funktionelle Parameter der Versuchstiere auswirkt.

Die kontinuierliche Applikation von Angiotensin II in einer niedrigen Dosierung erfolgte über eine osmotische Mikropumpe (Abbildung 1.2), die den Mäusen subkutan eingesetzt wurde. Um eine konstante Förderrate (0,11µl/h, laut Herstellerangaben über 28 Tage gewährleistet) zu erreichen, wird die AngiotensinII-Menge (500 ng/kg/min) in der Pumpe an das Körpergewicht der Mäuse angepasst (entspricht für eine Maus im Durchschnitt 0,72 mg/kg/d). Der Kontrollgruppe wurden mit NaCl befüllte Pumpen implantiert.



Abbildung 1.2: Abbildung der verwendeten osmotischen Pumpe der Firma SIGMA (Modell ALZET), die mit Angiotensin II (low-dose, 500ng/kg KG/min) befüllt wurde

Die chronische Infusion von AT II wurde vielfach eingesetzt, um ein Modell für die Entstehung chronischer arterieller Hypertonie zu simulieren. Im Gegensatz dazu beeinflusst die Applikation von niedrig-dosiertem AT II das kardiovaskuläre System, ohne dabei eine systemische arterielle Hypertonie zu induzieren. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass es im Gegensatz zu den in der Literatur verwendenden Angiotensin-Modellen durch die Applikation einer niedrigen Dosis an Angiotensin II (low-dose: 500ng/kg Körpergewicht KG/min) nicht zur Ausbildung einer ausgeprägten kardialen Hypertrophie kommt [88,106].

Durch die kontinuierliche niedrig dosierte AT II-Applikation werden alle drei Stadien der diastolischen Dysfunktion erreicht, so dass es nach 7 Tagen zu einer Relaxationsstörung kommt. Nach vier Wochen findet sich bei allen Mäusen eine mäßige (Stadium der Pseudonormalisierung) bis schwere (Compliancestörung mit restriktivem Flussprofil) diastolische Funktionsstörung.

Für die Untersuchung zeitabhängiger Prozesse wurden zwei Versuchsgruppen (7 und 28 Tage) mit einer jeweiligen Gruppenstärke (n) von 20 Tieren gebildet. Nach zwei und vier Wochen wurden die diastolischen Funktionsparameter mithilfe der Echokardiographie validiert. Als Marker einer manifesten diastolischen Funktionsstörung wurde analog zur echokardiographischen Untersuchung beim Menschen auch im Mausmodell das Verhältnis (E/E<sup>'</sup>) des passiven frühdiastolischen Einstroms im Mitraleinstromprofil (E) zur dopplerechokardiographisch bestimmten passiven Füllung des Ventrikels (E<sup>'</sup>), und das Verhältnis zwischen früher und später Mitralklappen-Flussgeschwindigkeit (E<sup>'</sup>/A<sup>'</sup>) bestimmt (Abbildung 1.3).



Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der echokardiographischen Validierung des Mausmodells mit isolierter diastolischer Dysfunktion. Die Ejektionsfraktion bleibt durch die Applikation von Angiotensin II unverändert, es entsteht eine isolierte diastolische Funktionsstörung.

EF=Ejektionsfraktion, E/E' = Verhältnis des passiven frühdiastolischen Einstroms im Mitraleinstromprofil (E) zur passiven Füllung des Ventrikels (E')

Der G-CSF- Gruppe wurde nach einer bzw. nach vier Wochen für sieben Tage G-CSF (300 µg/kg KG\*d-1) subkutan verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt für denselben Zeitraum NaCl in gleicher Menge und Darreichungsform.

Ziel war es, durch die Applikation von Angiotensin II eine diastolische Funktionsstörung in der Maus zu induzieren, und anschließend zu untersuchen, durch welche Mechanismen die Gabe von G-CSF zur Verbesserung der kardialen Funktionsparameter führt. Die folgende Abbildung verdeutlicht das verwendete Studiendesign (Abbildung 1.4).



Abbildung 1.4 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit Zeitplänen C57Bl/6-Mäuse mit implantierter Angiotensin-II-Pumpe. Die Fremdkörperimplantation der osmotischen Pumpe, die mit AT II befüllt wurde, erfolgte subkutan auf den Rücken.

1a = Versuchsgruppe AT II Pumpe für insgesamt 14 Tage, ab Tag 7 für 7 Tage G-CSF/ NaCl,

1b =Versuchsgruppe AT II Pumpe für insgesamt 35Tage, ab Tag 28 für 7 Tage G-CSF/ NaCl.

Untersucht werden soll die Wirkung von G-CSF auf morphologische und funktionelle Parameter des Myokards durch molekularbiologische und histologische Methoden.

AT II= Angiontensin II, G-CSF= Granulocyte-colony stimulating factor, NaCl=Natriumchlorid, Echo= Echokardiographie

#### 1.9 Zielsetzung und Fragestellung

Die chronische Herzinsuffizienz stellt nach wie vor eine der bedeutendsten und häufigsten kardiovaskulären Erkrankung dar und ist damit von enormer sozioökonomischer Relevanz. Bei ca. der Hälfte der Patienten mit Herzinsuffizienz liegt eine isolierte diastolische Funktionsstörung vor. Bisherige Therapieansätze beschäftigen sich mit der symptomatischen Behandlung des meist vorliegenden Hypertonus und des dadurch resultierenden kardialen Remodeling. Hinsichtlich der außerordentlichen Bedeutung der Fibrose in der Pathogenese der DHF stellt die medikamentöse Reduktion der vorhandenen Fibrose einen essenziellen Therapieansatz dar.

Ein kurativer spezifischer Therapieansatz liegt bislang nicht vor.

Ausgehend von der Aufgabe, einen kurativen Therapieansatz für diastolische Funktionsstörung zu finden, wird in der vorliegenden Studie an einem Mausmodell untersucht, inwiefern der Einsatz von G-CSF zu einer Funktionsverbesserung kardialer Parameter führt. Insbesondere wird die Frage verfolgt, welche pathophysiologische Rolle G-CSF im Kontext des myokardialen Remodeling bei diastolischer Funktionsstörung spielt.

Die Arbeit geht von der Hypothese aus, dass es durch den Einsatz von G-CSF zu einer Reduktion der Fibroseparameter kommt, die nicht über eine verminderte Aktivierung klassischer Inflammationstargets bedingt ist. In diesem Zusammenhang soll die Einwanderung von Entzündungszellen sowie die Expression klassischer Inflammationstargets untersucht werden.

Darüber hinaus wird die Annahme getroffen, dass sich G-CSF auf Bestandteile der Gap Junctions auswirkt, und durch die Beeinflussung des elektrischen Remodeling zu einer Verbesserung der diastolischen Funktionsstörung führt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu untersuchen, über welche Mechanismen G-CSF im Rahmen der diastolischen Funktionsstörung am Mausmodell auf kardiale Funktionsparameter wirkt.

## 2. Material und Methoden

#### 2.1 Tierexperimentelle Methoden

Im nachfolgenden Teil werden alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten tierexperimentellen, molekulargenetischen und immunhistologischen Methoden beschrieben. Protokolle, die nicht genauer erklärt werden, erfolgten nach gängiger Laborpraxis [24], oder, wenn kommerziell erhältliche Kits benutzt wurden, gemäß den Angaben der Hersteller. Dasselbe gilt für Puffer und Lösungen, deren genaue Zusammensetzung nicht näher erwähnt wird. Eine Auflistung der verwendeten Materialen, Geräte und Lösungen befindet sich im Anhang.

#### Einschlusskriterien für diese Studie

In diese Studie wurden nur Tiere eingeschlossen, bei denen echokardiographisch durch einen erfahrenen Mitarbeiter des Labors eine manifeste diastolische Herzinsuffizienz nachgewiesen werden konnte. Durch die kontinuierliche low-dose Applikation von Angiotensin II wurden alle drei Stadien der diastolischen Dysfunktion durchlaufen. Nach 7 Tagen kam es in der Regel zu einer Relaxationsstörung, und nach 28 Tagen zeigten die meisten Mäuse eine mäßige (Stadium der Pseudonormalisierung) bis schwere (Stadium der Compliancestörung mit restriktivem Fluss Profil) diastolische Funktionsstörung. Die linksventrikuläre systolische Funktion zeigte sich demgegenüber ohne signifikante Veränderungen. Bei allen Tieren wurde Doppler- echokardiographisch eine DHF nachgewiesen, jedoch nicht durch invasive Methoden wie durch Messung des pulmonalen Venen Flusses (PVF) oder des Wedge-Drucks (Mean pulmonary capillary wedge pressure).

#### Ethische Grundlagen

Alle Tierexperimente erfolgten unter strikter Einhaltung der Leitsätze der Gesellschaft für Versuchstierkunde sowie des Leitfadens für den Umgang und den Schutz von Labortieren [17]. Das Versuchsvorhaben war vom Regierungspräsidium Darmstadt vorab genehmigt worden (Gen. Nr. B 2/266, 05.09.2011).

#### Mäuse

Die für die Tierexperimente verwendeten C57Bl6-Wildtyp-Mäuse stammen von der Firma Janvier (Janvier S.A.S.; 53940 LE GENEST-ST-ISLE, Frankreich). Insgesamt wurden 60 weibliche, 10-11 Wochen alte Mäuse mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 19,21g verwendet.

Von den initial 60 operierten Mäusen wurde eine Maus (3888) 3 Wochen nach OP tot in ihrem Käfig aufgewunden. Zeichen einer äußeren Verletzung waren nicht ersichtlich. Die 60 operierten Mäuse wurden in folgende Versuchsgruppen aufgeteilt (Tabelle 2.1):

| Anzahl Versuchstiere | Wirkstoffgruppe | Versuchszeitraum |
|----------------------|-----------------|------------------|
| 24                   | G-CSF           | 28+7 =35 Tage    |
| 16                   | NaCl            | 28+7 =35 Tage    |
| 12                   | G-CSF           | 7+7=14 Tage      |
| 8                    | NaCl            | 7+7=14 Tage      |

Tabelle 2.1: Einteilung und Anzahl der Versuchstiere, insg. 60 C57Bl6- Wildtyp- Mäuse

#### **Angiotensin II-Pumpen**

Bei den Angiotensin II- Pumpen handelt es sich um osmotische Mikropumpen der Firma SIGMA, Modell ALZET Micro Osmotic Pump 1004. Die Pumpen werden 48h vor OP-Beginn mit 230-250µl gelöster Angiotensin II-Lösung befüllt und inkubieren anschließend im 37°C warmen Wasserbad, um so eine ausreichende Abgabe von Angiotensin II ab dem Zeitpunkt der Implantation der Pumpe zu gewährleisten.

#### **Implantation der ALZET- ATII- Pumpen**

Den Tieren wurde 30 Minuten vor OP-Beginn für die Analgesie subkutan 100µl/ 25g KG 1:100 verdünntes Buprenorphin verabreicht. Die Narkoseeinleitung für die Pumpenimplantation erfolgte im allseits verschlossenen Becherglas durch Zufuhr von 5% Isofluran-Luft-Gemisch (5% Forene) über einen Isofluranverdampfer (Maus-Ventilator Mini-Vent Type 845, Firma Sachs). Die Inhalalationsnarkose wurde mit dem Isofluran-Luft- Gemisch (2% Forene) während der Operation aufrechterhalten. Die Mäuse wurden am oberen Rücken geschoren, in Bauchlage auf einer beheizten Wärmeplatte gelagert, und an den hinteren Pfoten auf der Wärmeplatte mit Tape fixiert. Die geschorene Rückenfläche wurde mit Betaisodonna desinfiziert. Anschließend wurde eine ca. 0,6 cm lange Inzision durch Cutis und Subcutis über der Brustwirbelsäule, im 90°-Winkel zur Medianen vollführt. Den Tieren wurde subkutan 200µl NaCl zur Flüssigkeitssubstitution und 100µl des nichtsteroidalen Antiphlogistikums Rimadyl appliziert.

Die entstandene Haut-Öffnungsfläche wurde mit einer stumpfen, geschlossenen Schere noch vergrößert, die Subkutis wurde von der Muskulatur in der Medianen nach caudolateral getrennt, und die ALZET- Pumpe (Modell 2004, AngiotensinII 500ng/kg/min) unter der Haut eingebracht.

Abschließend wurde die Wunde mit Hilfe von drei einzelnen, resorbierbaren Knopfnähten mit Perma Handseide (5-0 P1 Nadel) verschlossen. Um die gegenseitige Verletzung durch Kämpfe oder "Abknabbern" zu vermeiden, wurden die Mäuse nach der Operation für eine Woche einzeln in Käfige gesetzt und nach Ablauf dieser Schonphase wieder zusammengesetzt. Ein Tag post OP bekamen die Mäuse zur Infekt-Prophylaxe erneut 100µl Rimadyl s.c. injiziert.

#### Applikation von G-CSF/ NaCl

Den Tieren wurde je nach Versuchsgruppe für 7 bzw. 28 Tage 500ng/kg/min Angiotensin II über eine osmotische Minipumpe zugeführt. Anschließend wurde den Tieren der NaCl-Gruppe für 7 Tage täglich NaCl subkutan gespritzt, den Tieren der G-CSF-Gruppe wurde für eine Woche G-CSF (Granocyte® 300 µg/kg KG\*d-1) einmal täglich subkutan appliziert. Die Berechnung der für die Behandlung zu spritzenden Menge basierte auf folgendem System (Tabelle 2.2):

| GRANOCYTE® 34Mio. IE/ml, CHUGAI | 20-25g KG Maus | 80µ1 s.c.  |
|---------------------------------|----------------|------------|
| GRANOCYTE® 34Mio. IE/ml, CHUGAI | 25-30g KG Maus | 160µl s.c. |

Tabelle 2.2: Berechnung der für die Behandlung zu spritzenden G-CSF-Menge, (Granocyte® 300 µg/kg KG\*d-1)

Der G-CSF-Gruppe wurde nach 1 (7 Tage) beziehungsweise nach 4 Wochen (28 Tage) für sieben Tage G-CSF ( $300 \mu g/kg/KG$ ) subkutan verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt für denselben Zeitraum NaCl in gleicher Menge und Darreichungsform.

Ziel war es, durch die Applikation von Angiotensin II eine diastolische Funktionsstörung in der Maus zu induzieren, und zu untersuchen, durch welche Mechanismen die Gabe von G-CSF zur Verbesserung der kardialen Funktionsparameter führt.

Die Abbildung 1.4 verdeutlicht das Studiendesign (Abbildung 1.4).

#### Euthanasie der Mäuse

Nach Ablauf des Versuchszeitraums von 14 bzw. 35 Tagen wurden die Mäuse mit Ketaminxylazin narkotisiert und durch zervikale Dislokation mit sofortigem Blutentzug aus dem retrobulbären Plexus getötet. Es folgte die Organentnahme zur weiteren Aufarbeitung. Die Präparate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80° C gelagert.

Alle Tiereingriffe wurden unter der Supervision von Frau Dr. vet. med. Sandra Voß sowie durch die TA Sigrun Saß durchgeführt.

#### 2.2 Echokardiographie

Die Echokardiographie ist eine der wichtigsten diagnostischen Methoden, um die Myokardinsuffizienz mit erhaltener systolischer Funktion darzustellen. Sie dient als Standardmethode zur Evaluierung von Patienten mit Verdacht auf Herzinsuffizienz, da sich mit ihrer Hilfe die linksventrikuläre systolische Funktion global und regional beurteilen lässt. Die diastolische Funktionsstörung wurde durch verschiedene echokardiographische Parameter in drei Grade kategorisiert. Für Reihenuntersuchungen der myokardialen Funktion wurden die Tiere einen Tag prae operationem sowie zu den jeweiligen, definierten Versuchszeitpunkten mit Isofluran anästhesiert (Inhalationsnarkose, Isofluran 1,5%) und echokardiographisch untersucht (VisualSonics Vevo770 high-resolution imaging system, 30-MHz Schallkopf, VisualSonics, Toronto, Canada). Linksventrikuläre Durchmesser in Systole und Diastole (LVIDd und LVIDs), interventrikuläre Septumdicke (IVSd) und linksventrikuläre Hinterwanddicke (LVPWd) werden ebenso wie die Ejektionsfraktion (EF) und die Verkürzungsfraktion (fractional shortening, FS) in der parasternalen langen Achse gemessen.

Zusätzlich wurden die Parameter der linksventrikulären systolischen Funktion in der parasternalen kurzen Achse gemessen. Die linksventrikuläre Masse berechnete sich nach der Formel von Gardin. Der Durchmesser des linksventrikulären Ausflusstrakts (LVOT) wurde auf Höhe der Aortenklappe bestimmt.

Das Einstromprofil über der Mitralklappe sowie die Messung der isovolumetrischen Relaxationszeit und der Dezelerationszeit erfolgen im apikalen Vierkammerblick. Der Quotient aus früdiastolischem transmitralen Einstrom in den linken Ventrikel und Relaxationsgeschwindigkeit am Mitralklappenring (E/E<sup>^</sup>) korreliert mit dem Füllungsdruck des linken Ventrikels. Die diastolischen Funktionsparameter werden durch Gewebedoppler komplettiert. Alle echokardiographischen Parameter werden mit dem Softwaretool des VisualSonics Vevo770 Systems analysiert.

Die echokardiographischen Untersuchungen und Analysen wurden von Herrn MD, PhD Baktybek Kojonazarov und Herrn Dr. Sebastian Szardien durchgeführt.
## 2.3 Molekularbiologische und histologische Methoden

## 2.3.1 Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

## **RNA-Isolierung**

Für die Gewinnung der zellulären Ribonukleinsäuren (RNA) aus Zellen und Gewebe wurde das RNeasy Micro bzw. Mini Kit der Firma QIAGEN verwendet. Dazu wurde das Gewebe mit Hilfe der Schwingermühle zerkleinert und homogenisiert. Anschließend wurde für den DNase-Verdau nach Angaben des Herstellers DNase zugesetzt, um jegliche genomische DNA zu zerstören.

### **RNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentration der isolierten Gesamt-RNA wurde im Spektralphotometer (NanoDrop) anhand der optischen Dichte (OD) der RNA gegenüber einer Nukleinsäurefreien Pufferlösung bestimmt. Das Spektralphotometer misst dabei unter Verwendung einer Quarzküvette die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum von RNA).

Um den Reinheitsgrads der RNA zu bestimmen, wurde der Absorptionsquotient über das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm und bei 280 nm Wellenlänge gebildet. Dieser Quotient OD 260/ OD 280 sollte für eine reine Nukleinsäurelösung einen Wert von größer als 1, 8 betragen, um in die Studie eingeschlossen zu werden. Vor jeder Messung wurde die Quarzküvette mit Ethanol gereinigt und ein Nullabgleich mit Wasser durchgeführt.

## **Reverse Transkription**

Mittels der Reversen Transkription wurde die zuvor isolierte RNA für die Durchführung der PCR in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, da die Ribonukleinsäuren nicht als eigenständige Templates verwendet werden können. Hierzu verwendete man die reverse Transkriptase (rT). Diese RNA-abhängige DNA-Polymerase kann aus Retroviren wie beispielsweise dem Avian-Myeloblastose Virus (AMV) oder dem Moloney-Murine-Leukemia Virus (MMLV) gewonnen werden.

Unter Verwendung des SuperScript II Reverse Transkriptase Kits wurden 200 ng/µl Random Primer mit 1 µg RNA vermischt und auf 12 µl ddH 20 aufgefüllt. Die Primerhybridisierung fand bei 65°C für 5 min statt. Anschließend wurden 2 µl DTT (0,1 M), 4 µl First-Strand- Reaktionspuffer und 1 µl RNaseOUT (RNase-Inhibitior, 40 U/µl) dazugeben. Nachfolgend wurden die Ansätze mit 1 ml Superscript II RT versetzt und für 2 min bei 25°C inkubiert. Es folgten drei weitere, unten aufgelistete Inkubationsschritte bei verschiedenen Temperaturen (Tabelle 2.3). Der letzte Inkubationsschritt bei 70°C diente der Inaktivierung der Reaktion. Die entstandenen cDNA-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

| Inkubation | 25°C | 10 min |
|------------|------|--------|
| Inkubation | 42°C | 50 min |
| Inkubation | 70°C | 15 min |

Tabelle 2.3: Aufführung der für die Reverse Transkription durchgeführten Inkubationsschritte

## Primerauswahl

Die sequenzspezifischen Primer wurden mithilfe des Programms FastPCR ausgewählt. Die Auswahl basierte auf den Ergebnissen der Recherche von cDNA-Sequenzen bei Pubmed. Bei der Auswahl für die quantitative Real-time-PCR (qRT-PCR) spielten sowohl die Spezifität der Trankskripte als auch die Größe des PCR-Produkts eine Rolle. Die Größe des PCR-Produkts sollte dabei zwischen 100 und 180bp liegen.

## **Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der selektiven Amplifizierung polymerer DNA-Fragmente. Der Ausgangspunkt ist ein doppelsträngiger DNA-Abschnitt, der die gewünschte Sequenz enthält und als Matrize fungiert. Durch Hitze wird der DNA-Doppelstrang denaturiert, die entstandenen Einzelstränge werden durch eine DNA-Polymerase verlängert. Jeder PCR-Zyklus besteht aus den drei Schritten Denaturation, Primerhybridisierung (Annealing) und Amplifikation:

Denaturation: Trennung der DNA -Doppelstränge in einzelne Stränge Primerhybridisierung: Primer bindet an die Ziel-Sequenz der DNA -Einzelstränge Elongation: Amplifikation: Vervielfachung der Zielsequenz durch eine DNA-Polymerase.

Durch die Wiederholung der drei Vorgänge Denaturierung, Primerhybridisierung und Amplifikation wird die Zielsequenz exponentiell vermehrt.

Für die Durchführung der Endpunkt-PCR wurde eine Taq-DNA-Polymerase verwendet. Diese hitzestabile DNA-Polymerase ist für die eigentliche Synthese der DNA zuständig: sie führt bei 72° C zur Polymerisation der hybridisierten Oligonukleotide und damit zur Verlängerung des DNA-Strangs.

| Primer 1 (Forward)   | 0,5 µl  |
|----------------------|---------|
| Primer 2 (Reward)    | 0,5 µl  |
| 10x PCR Puffer       | 2,5 µl  |
| 10 mM dNTP Mix       | 0,5 µl  |
| 50 mM MgCl2          | 0,6 µl  |
| cDNA-Template (1:10) | 1 µl    |
| ddH2O                | 18,9 µl |
| Taq Polymerase       | 0,5 µl  |

Für einen 25µl Ansatz wurden verwendet (Tabelle 2.4).

Tabelle 2.4: Bestandteile der Polymerase-Ketten-Reaktion. Abkürzungen: PCR, polymerase chain reaction; DNA, deoxyribose nucleic acid

Die PCR-Ansätze wurden in einer Reinbank auf Eis pipettiert. Um Pipettierfehler zu vermeiden, wurde zunächst ein Mastermix angesetzt. Die Ansätze wurden gevortexet, abzentrigufiert und in das PCR-Cycler-Gerät gestellt. Die optimale Annealing-Temperatur ist von Länge und Sequenz der Primer abhängig und wurde daher für an Hand einer an Gradienten-PCR ermittelten Primer-Paares neu ermittelt.

| Initiale Denaturierung der DNA  | 94°C | 5 min  | 1 Zyklus  |
|---------------------------------|------|--------|-----------|
| Denaturierung der DNA           | 94°C | 30 sec | 30 Zyklen |
| Primerhybridisierung/ Annealing | 94°C | 30 sec | 30 Zyklen |
| Elongation                      | 72°C | 30 sec | 30 Zyklen |

Für den PCR-Cycler wurde folgendes Standard-Programm gewählt (Tabelle 2.5):

Tabelle 2.5: Standard-Programm für die Zyklen in der quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

## Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Echtzeit PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) ist wie die PCR ein molekularbiologisches Verfahren, die der Vervielfältigung von Nukleinsäuren dient. Die qRT-PCR ermöglicht jedoch neben der Vervielfältigung auch die Quantifizierung der replizierten DNA- Fragmente.

Die Quantifizierung erfolgt dabei über Fluoreszenz-Messungen. Dazu wird dem qRT-PCR-Ansatz neben den sequenzspezifischen Primern ein fluoreszierender Reporterfarbstoff (hier: SYBR Green) zugegeben, der nur nach seiner Bindung an doppelsträngige DNA Fluoreszenzsignale emittiert. Die Fluoreszenzzunahme ist direkt proportional zum Zuwachs des PCR-Amplifikats. Die Messung erfolgt am Ende jedes PCR-Zyklus. Dabei gilt, dass je häufiger die Matrizen-DNA am Anfang der Reaktion vorhanden ist, desto weniger PCR-Zyklen sind notwendig, um den Punkt zu erreichen, an dem das Fluoreszenzsignal signifikant höher ist als der Fluoreszenzhintergrund. Dieser Punkt wird als Ct-Wert (Threshold-Cycle) bezeichnet und ermöglicht die Konzentrationsbestimmung der spezifischen mRNA in der Probe.

Vor jedem qRT-PCR-Lauf wurde die Effizienz der verwendeten Primer und der dynamische Bereich der PCR-Reaktion ermittelt, indem die cDNA über vier Zehnerpotenzen verdünnt und in der qRT-PCR eingesetzt wurde. Jede qRT-PCR wurde als Triplikat durchgeführt, um experimentelle Schwankungen zu vermeiden. Die PCR-Ansätze wurden in einer Reinbank auf Eis pipettiert.

Für eine qRT-PCR wurde folgender 25 µl Ansatz gewählt (Tabelle 2.6):

| cDNA  | 350 ng, 1:10 Verdünnung, 1 μl |
|---|-------------------------------|
| Forward Primer                              | 0,5 µl                        |
| Reverse Primer                              | 0,5 µl                        |
| Primer2x PCR MasterMix SYBR Green Super Mix | 12,5 µl                       |
| ddH2O                                       | 10,5 µl                       |

Tabelle 2.6: Bestandteile der qRT-PCR

Der IQ SYBR Green Super Mix enthielt neben der Taq-Polymerase Reaktionspuffer, Nukleotid-Mix und SYBR Green. Die PCR-Reaktion erfolgt in 96-Well-Mikrotiterplatten. Die Ansätze wurden durchmischt, kurz abzentrifugiert und die Amplifikation in dem qRT-PCR-Cycler nach genspezifischem Thermoprofil durchgeführt. Um eine spezifische Bindung der Primer zu überprüfen und Fluoreszenzartefakte zu identifizieren, erfolgte nach jedem PCR-Lauf eine Schmelzpunktanalyse. Die relative Menge an mRNA des Zielgens wurde gegenüber einem konstitutiv exprimierten Gen normalisiert (hier GAPDH). Die relative Quantifizierung der mRNA wurde als relativer "Foldchange" gegenüber der Kontroll-RNA ausgedrückt [83]. Dabei wurden die gemessenen Fluoreszenzsignale der Kontrolle in der Regel auf 1 gesetzt und die Fluoreszenzsignale der Probe als Vielfaches von 1 ausgedrückt.

### 2.3.2 Western Blot

Der Western Blot ist ein molekularbiologisches Verfahren, das dem Nachweis spezifischer Antigene mit Hilfe markierter Antikörper dient. Das Verfahren beruht auf dem Prinzip der Gel-Elektrophorese, bei der native oder denaturierte Proteine in einem angelegten Spannungsfeld durch ihre unterschiedlichen Molekülgrößen und Ladungen ein unterschiedliches Wanderungsverhalten im Gel aufzeigen.

Die Proteine werden nach deren Auftrennung in Polyacrylamidgelen durch ein Blotting-Verfahren auf eine Membran mit Proteinbindungseigenschaften übertragen (engl. Blotting). Die Übertragung der Proteine erfolgte im sogenannten "Semi-dry" (engl. Halb trocken) -Blotting-Verfahren über puffergesättigte Filterpapiere.

### Proteinisolierung und Proteinbestimmung aus Gewebe

Für die Durchführung des Western Blots müssen die Proteine vorher aus Gewebe isoliert werden. Dazu wurde eine Roche complete mini EDTA-freie Tablette in 10 ml Präparationspuffer gelöst. Die tiefgefrorenen Gewebsproben (- 80°C) werden bis zur weiteren Verarbeitung in Flüssigstickstoff gelagert.

Das angetaute Gewebsstückchen wurde zusammen mit einer Mahlkugel (5 mm Ø) und dem Puffer in ein 2 ml Tube gegeben und für 2 min bei 20 F/s in der Schwingmühle zerkleinert. Anschließend wurde die Probe für 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert, und der Überstand in ein neues Tube überführt. Durch dieses Protokoll erhielt man ca. zwischen 100-200µl Homogenat pro Biopsie. Davon werden bei einer 1:10 Verdünnung 20 µl zur Proteinbestimmung nach Lowry benötigt. Das restliche Homogenat wurde in flüssigem Stickstoff wieder schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei – 20°C aufbewahrt. Abschließend wird photometrisch der quantitative Proteingehalt nach Lowry bestimmt.

### Proteingehaltbestimmung nach Lowry

Die Bestimmung des Proteingehalts durch ein Protein-Assay (BioRad) bezieht sich auf die Methodik nach Lowry, nach der der Proteingehalt löslicher und unlöslicher Proteine bestimmt werden kann.

Für die quantitative Messung des Proteingehalts werden je 5  $\mu$ l der Standard Verdünnungsreihe als Triplikate in eine 96-well-Platte pipettiert. Die zu messenden Proben werden 1:10 bis 1:20 verdünnt mit Wasser und ebenfalls als Triplikate pipettiert. Pro Well werden dann jeweils 25  $\mu$ l/Slot der Reagenz A + S von Biorad im Verhältnis 1:50 gegeben. Anschließend werden 200  $\mu$ l Reagenz B in die Wells pipettiert und die eventuell aufgetretenen Luftblasen mit einer Pipettenspitze entfernt. Es folgt die lichtgeschützte Inkubation der Proben für 15 min bei Raumtemperatur und die abschließende photometrische Messung im ELISA-Reader. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 690 nm gegen den Leerwert gemessen. Abhängig vom Ergebnis der Proteinbestimmung erfolgte der Einsatz der Proben in der jeweilig benötigten Menge.

## Polyacrylamid- Gelelektrophorese, Laemmli- System

Anhand der ermittelten Proteinmenge wird mithilfe des Officeprogramms Excel die nötige Menge an Lysat, Ladepuffer und Reducing Agent (RA) zur Entfernung sekundärer und tertiärer Strukturen innerhalb der Proteine (meist Disulfidbrücken zu Sulfhydryl-Gruppen) berechnet, die die konsekutive Auftrennung der Proteine durch ihre molekulare Größe ermöglicht. Je nach Protokoll werden die Proben vorher für die Denaturierung bei 5 min im Wasserbad gekocht. Für die Reduzierung wird 1/10 des Gesamtvolumens des Reduktionsmittels (Dithiothreitol, Invitrogen) zur Probe hinzugegeben. Für die vertikale Elektrophorese von Proteinen wurde das Criterion-TGX (Tris-Gycine eXtended) -System der Firma BIO-RAD verwendet. Der Aufbau und die Ausstattung der Gelapparatur erfolgten nach den vom Hersteller empfohlenen Richtlinien.

Das folgende Gelsystem wurde dabei verwendet:

4-20 % Criterion TGX Trix-Glycine Precast Gel, Bio-Rad 12/18/26 Wells.

Die Gelelektrophorese wurde nach folgenden vier Kriterien durchgeführt:

Denaturiert-Reduziert Denaturiert- Nicht Reduziert Nicht denaturiert-Reduziert Nicht denaturiert- Nicht reduziert

Die erste Tasche des Gels wurde mit 4µl Precision plus Standard gefüllt, die weiteren Taschen wurden mit der errechneten Probenmenge gefüllt. Als Größenstandard diente der

Precision Protein StrepTactin-HRP Conjugate der Firma BIO-RAD. Pro Slot wurden 35 µg der Proben aufgetragen. Die freien Wells wurden zur Verhinderung des Smiley-Effekts mit Ladepuffer gefüllt. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte bei einer von der Molekulargröße des Targets und des Gels abhängigen Spannung bei 45-90 Minuten bei 150 V. Nachdem die Elektrophorese beendet wurde, wurde das Sammelgel verworfen, und das Trenngel für den Transfer auf die Nitrozellulosemembran für einige Minuten in Transferpuffer äquibriliert.

### Blotting der Proteine, Semi-Dry-Verfahren und Immunoblotting

Für die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulose-Trägermembran wurde der Semi-Dry- Elektroblotter der Firma Biozym verwendet. Nach der Elektrophorese wurde der Sandwich-Blot luftblasenfrei zusammengebaut. Der Protein-Transfer wurde bei Raumtemperatur mit einer konstanten Stromstärke von 158mA für 120 min durchgeführt. Anschließend wurde der Erfolg des Transfers durch Färbung der Proteine auf der Membran mit Ponceau-Rot überprüft, indem die Membran für ca. 5 min in Ponceau-Lösung geschwenkt und danach mit destilliertem Wasser solange entfärbt wurde, bis Proteinbanden zu sehen und damit das Transferergebnis zu beurteilen waren. Dabei wurde der Längenstandard abgeschnitten und separat behandelt, um eventuelle Kreuzreaktionen mit Strep Tactin HRP conjugate zu verhindern.

Nach dem Transfer und der Färbung mit Ponceau erfolgte der Nachweis der Proteine auf der Nitrozellulosemembran durch Blocken der Membran in 5 % Milchpulver, gelöst in Tris-gepuffertem Salz-Puffer mit 20%-Polysorbat (TBS-T20), für 1h bei Raumtemperatur. Dies diente dem Abdecken unspezifischer Bindungsstellen für die sich daran anschließende Immundetektion.

Dazu wurde die Nitrozellulose für einen festgelegten Zeitraum wiederholt mit 10ml TBST gewaschen und anschließend bei jeweils spezifischen Bedingungen in der optimalen Primärantikörperlösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach jeder Inkubation wurde der Blot erneut gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper, meist einem Peroxidase-gekoppelten Antikörper, für 1h bei Raumtemperatur inkubiert.

Der Nachweis des im Gewebe enthaltenen Proteins erfolgte durch Markierung des Antigens mit einem spezifischen Antikörper, welcher anschließend mit Hilfe chemilumineszenter Antikörper detektiert werden kann. Diese Detektion der Membran erfolgte nach erneutem Waschen der Nitrozellulosemembran in 10ml TBST (7x7 min) mit dem ECL-Kit (Enhanced Chemiluminiscent Reaction) der Firma Roche.

Die Konzentration und Verdünnung der jeweiligen Antikörper sind im Anhang aufgeführt. Die Inkubations- und Waschschritte wurden wie in untenstehender Tabelle durchgeführt:

| Primär-AK   | 10ml 5 % Milchpulver/ BSA | Über Nacht | 4°C |
|-------------|---------------------------|------------|-----|
| Waschen     | 10 ml TBST                | 7 x7 min   | RT  |
| Sekundär-AK | 10ml 5 % Milchpulver/ BSA | 1 h        | RT  |
| Waschen     | 10 ml TBST                | 7 x7 min   | RT  |
| Entwicklung | West Durakit              |            | ·   |

Tabelle 2.7: Darstellung der für das Immunoblotting verwendeten Inkubations- und Waschschritte

Nach dem letzten Waschvorgang wurde die Membran in 1, 5ml der Luminollösung SuperSignal West Dura der Firma ThermoScientific für 1 min inkubiert und anschließend mit dem ChemiDoc XRS+ der Firma BIORAD für 30 bis 500 ms belichtet.

Vor der Quantifizierung der Ergebnisse erfolgte die Festlegung eines Normalisierungsstandards: die Signale der Proteine  $\beta$ -Catenin, Connexin-43 und Kollagen-I wurden gegen das Signal von GAPDH normalisiert.

GAPDH ist ein sogenanntes House-Keeping-Gen, dessen Expression im Myokard nicht beeinflusst wird, und sich somit für die Verwendung als Normalisierungsstandard eignet. Die Fluoreszenzsignale wurden mit dem ChemiDoc XRS Imaging System (BioRad) digitalisiert, die densitometrische Analyse der Immunoblot-Banden wurde mit der Software Image Lab 3.0.1 ausgewertet.

### 2.3.3 Histologische Methoden

## Anfertigung der Gefrierschnitte

Die ca.  $1 \times 0.4 \ge 0.5$  cm großen Herzen wurden nach ihrer Entnahme in Epoxidharz (Tissue-Tek) eingebettet und bei -80°C konserviert. Für die Anfertigung der Gefrierschnitte wurden die Herzen mit Tissue-Tek auf Aluminumzylinder aufgeblockt. Von jedem Gewebeblock wurden mit Hilfe der Schnittstreckerplatte 6µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und auf silanebeschichtete Glasobjektträger übertragen. Abschließend wurden alle Schnitte für 10 min in Paraformaldehyd (PFA) bei Raumtemperatur fixiert. Die Arbeitstemperatur im Kryostat betrug – 20°C.

### Immunhistochemische Untersuchung des Gewebes

Die immunhistologische Untersuchung ermöglicht die Detektion von antigenen Strukturen in Zellen und Gewebe. Mit Hilfe spezifischer mono- bzw. polyklonaler Antikörpern, die an das gesuchte Antigen binden, wird der Antigen- Antikörper-Komplex im Gewebe markiert und sichtbar gemacht. Immunhistologisch lassen sich Antigen-Antikörper-Komplexe mit der direkten oder indirekten Methode detektieren. Bei der direkten Methode wird der spezifische Antikörper, der gegen das Epitop gerichtet ist, markiert. Im Gegenzug dazu bindet bei der indirekten Methode ein unkonjugierter Primär-Antikörper an das Antigen. Im zweiten Schritt wird ein spezifischer Sekundärantikörper verwendet, welcher sich gegen den ersten Antikörper richtet. Dieser Sekundärantikörper ist meist markiert und erlaubt so die Detektion des Antigen-Antikörper- Komplexes. Das am häufigsten eingesetzte Färbe-Verfahren stellt die Labelled- StreptAvidin-Biotin- Methode (LSAB) dar, das auf der hohen Affinität von Streptavidin und Avidin zu Biotin beruht. Der biotinylierte Sekundärantikörper bindet über eine Komplexbildung an Cy- markiertes Streptavidin. Der letztendliche Nachweis des Antigen- Antikörper-Komplexes, der somit auch die Lokalisierung im Gewebe ermöglicht, erfolgt durch Anregung der verwendeten Fluorochrom-markierten Antikörper mit UV-Licht. Die Markierung der Antikörper mit unterschiedlichen Fluorochromen ermöglicht die Mehrfachdarstellung unterschiedlicher Antigene in einem

| Fixation              | PFA 4%               | 10 min    | RT  |
|-----------------------|----------------------|-----------|-----|
| Waschen               | PBS                  | 3 x 3 min | RT  |
| Inkubation            | Primär-AK            | 60 min    | RT  |
| Waschen               | PBS                  | 3 x 3 min | RT  |
| Inkubation            | Sekundär-AK          | 60 min    | RT  |
| Waschen               | PBS                  | 3 x 3 min | RT  |
| Inkubation            | Kernfarbstoff        | 20 min    | RT  |
| Waschen               | PBS                  | 3 x 3 min | RT  |
| Eindeckeln            | Moviol               |           | RT  |
| Lichtgeschützte Lager | ung der Objektträger |           | 4°C |

Gewebeschnitt. Die immunhistochemischen Färbungen wurden wie in untenstehender Tabelle (Tabelle 2.8) durchgeführt.

Tabelle 2.8: Darstellung der für die immunhistochemische Färbung durchgeführten Inkubations- und Waschschritte, RT= Raumtemperatur, PBS= Phosphate Buffered Saline, PFA= Paraformaldehyde

Nach Fixierung der Präparate mit PFA wurden die Gewebsschnitte dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der Antikörper auf die Gewebsschnitte pipettiert, um die Gefrierschnitte dann bei Raumtemperatur für 60 min in einer lichtgeschützten, feuchten Kammer inkubieren zu lassen. Die Antikörper und Farbstoffe wurden auf die entsprechende Konzentration verdünnt und mit jeweils 50µl pro Gefrierschnitt aufgetragen. Für die Kollagen I- Färbung wurden die Schnitte nach dem dreimaligen Waschen mit PBS erneut für 3 min mit Citratpuffer (pH 6,0) gewaschen, und anschließend in einer Citratpufferlösung für 24 min der Mikrowellenstrahlung (720 Watt) ausgesetzt. Nach jeder Inkubation wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen. Alle Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur. Für das Eindeckeln wurden Deckgläschen mit Mowiol bestrichen und vorsichtig auf die feuchten Objektträger gedrückt, und Luftblasen mit dem Spatel weggestrichen. Die Präparate wurden lichtgeschützte bei 4°C gelagert.

### Picro Sirius Red- Färbung

Für die Untersuchung einer eventuellen Zunahme des Kollagengehalts wurde das Material anhand der Picro Sirius Red- Färbung analysiert. Sie ermöglicht eine morphometrische Messung des Kollagengehalts quantitative durch eine computergestützte Bildanalyse- Software (Adobe Photophop). Die Kollagenfasern stellen sich in dieser Färbung in Rot und das Zytoplasma der Muskelfasern in Gelb dar. Für die Berechnung des Gesamtkollagengehalts ausgehend von der immunhistochemischen Picrosirius Red Färbung wurde dabei nicht zwischen perivaskulärer und interstitieller Fibrose unterschieden. Die Präparate wurden unter dem Mikroskop (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar DM 1000 LED) bei 40-facher (Okular x Objektiv) Vergrößerung eingescannt, pro Maus 20 Bildausschnitte gewählt und der jeweilige Schnitt mäanderförmig abgefahren. Der in rot gefärbte Kollagenanteil der einzelnen linken Ventrikel wurde mit Hilfe der Software ImageJ bestimmt. Dazu wurde zuerst die gesamte Fläche des Präparats erfasst, und daraufhin das Kollagen markiert. Von diesem markierten Bild wurde nun der angefärbte Kollagenanteil in Prozent wiedergegeben, und dann als Mittelwert aller Einzelbilder berechnet.

### Kernfarbstoffe

Die Zellkerne können mit spezifischen Kernfarbstoffen angefärbt werden. Um eine bessere räumliche Darstellung der Antigene innerhalb des Gewebes zu gewährleisten, wurden in jedem Präparat die Kerne mit DAPI mit einer Verdünnung von 1:1000 ko-gefärbt und so im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht.

### **Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie**

Für die Auswertung der Präparate wurden die Schnitte mit dem Fluoreszenzmikroskop bei 40facher Vergrößerung im Auflichtverfahren belichtet. Es wurden den fluoreszenzmarkierten Antikörpern entsprechende Farbfilter gewählt, die kurzwelliges Licht emittieren, welches das jeweilige Fluorophor zur Emission länger welliger Strahlung anregt. Die digitale Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem LEICA Kamerasystem. Abschließend wurden die Bilder mit Hilfe des Programms ImageJ aufgenommen.

### 2.4 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 22.0.0.2 (IBM SPSS Statistics).

Die Mittelwertvergleiche wurden mit einfaktorieller parametrischer Anova (Prozedur UNIANOVA) analysiert. Die Residuen der Modelle wurden auf Normalverteilung und Ausreißer analysiert.

Bei Vorliegen einer gestörten Normalverteilung wegen einzelner Ausreißer (nicht mehr als einer) und sofern der Ausreißer- Wert ein realistischer Messwert war, wurde die Analyse doppelt durchgeführt. Die Analyse mit allen Fällen wurde durch die Analyse ohne Ausreißer validiert.

Im Falle einer Bestätigung der Ergebnisse durch die Analyse ohne Ausreißer wurden die Ergebnisse der kompletten Analyse berichtet, ansonsten beide. Bei erheblichen Verletzungen der Normalverteilungsannahme (mehrere Ausreißer, schiefe Verteilungen) wurden die Daten mittels nichtparametrischer Anova ausgewertet (Wilcoxon-Test bei annähernd gleicher Verteilungsform der Daten, Median-Test bei deutlich unterschiedlicher Verteilungsform zwischen den Gruppen). Im Fall von deutlicher Varianzheterogenität der Residuen kam der Post-Hoc-test von Tamhane (T2) zum Einsatz für die paarweisen Mehrfachvergleiche, im Fall von Varianzhomogenität der Sidak-Test. Beide Tests sind für kleine Fallzahlen und unbalancierte Designs geeignet. (vgl. zu den Testvoraussetzungen z.B. Horton 1978).

Das Alphafehlerniveau wurde auf 5 % Prozent festgesetzt. Das bedeutet in Verbindung mit der kleinen Fallzahl in den einzelnen Gruppen (2 bis 8), dass nur relative starke Mittelwertunterschiede als signifikant ausgewiesen werden können. Als statistisch signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% (p < 0.05) gewertet. Zwei offensichtliche Datenfehler wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

# 3. Ergebnisse

## 3.1 Effizienz des Tiermodells

Die Implantation einer osmotischen Pumpe mit kontinuierlicher Applikation von Angiotensin II führte zu einer diastolischen Funktionsstörung. Im Gegensatz zu bisher in der Literatur verwendeten Angiotensin-II-Modellen wurden Angiotensin-Pumpen mit einer niedrigen Angiotensin-II-Dosis (low-dose: 500ng/kg/min) implantiert, welche nicht zur Ausbildung einer ausgeprägten kardialen Hypertrophie führen, wie es für die Hochdosis-Applikation typisch ist. So wurde die pathologische neurohumerale Dysregulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und ihr Einfluss auf die Pathogenese der diastolischen Funktionsstörung im Modell simuliert. Durch die kontinuierliche niedrig dosierte Angiotensin-II-Applikation wurden alle drei Stadien der diastolischen Dysfunktion durchlaufen, wobei es nach 7 Tagen in der Regel zu einer Relaxationsstörung kam. Nach vier Wochen zeigen alle Mäuse eine mäßige (Stadium der Pseudonormalisierung) bis schwere (Compliancestörung mit restriktivem Flußprofil) diastolische Funktionsstörung.

Als verlässlicher Marker einer isolierten diastolischen Funktionsstörung konnte analog zur echokardiographischen Untersuchung beim Menschen auch im Mausmodell die linksventrikulären Ejektionsfraktion (EF) validiert werden, welche den Erhalt der systolischen Funktion darstellt.

In der folgenden Abbildung ist kein wesentlicher Unterschied des Parameters EF innerhalb der Versuchsgruppen HFpEF-7 Tage und HFpEF-28 Tage im Vergleich zur Sham-Gruppe, als auch im Vergleich HFpEF-7 Tage vs. HFpEF-28 Tage darstellbar. Die linksventrikuläre systolische Funktion bleibt durch die Applikation von Angiotensin II unverändert (Abbildung 3.1).



Abbildung 3.1: Darstellung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF).

Es lässt sich weder ein signifikanter Unterschied zwischen der Sham-Gruppe im Vergleich zu den beiden Versuchszeiträumen (7Tage und 28 Tage) noch innerhalb der beiden Versuchsgruppen (HFpEF-7Tage vs. 28 Tage) erkennen.

Die linksventrikuläre systolische Funktion bleibt durch die Applikation einer niedrig-dosierten Angiotensin-II-Pumpe unverändert.

## 3.2 Diastolische Funktionsstörung in der Echokardiographie

Zudem konnte echokardiographisch die diastolische Funktionsstörung anhand der diastolischen Funktionsparameter E'/A' und E/E' festgestellt werden. Das Verhältnis des passiven frühdiastolischen Einstroms im Mitraleinstromeinstromprofil (E) zur dopplerechokardiographisch bestimmten passiven Füllung des Ventrikels (E'), E/E' spielt eine essenzielle Rolle in der Diagnose der HFpEF. Der Parameter E'/A' stellt das Verhältnis der Geschwindigkeit des frühen transmitralen Flusses/ passiver frühdiastolischer Einstrom (E) zum späten transmitralen Fluss (A) im Gewebedoppler dar.

Bei 28-tägiger Angiotensin-II Infusion zeigte sich in der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe eine signifikante Beeinträchtigung der diastolischen Funktionsparameter, während bei den mit G-CSF behandelten Mäusen eine Normalisierung der diastolischen Funktion zu beobachten war (Abbildung 3.2).



Abbildung 3.2: Gewebsdoppler: Nach 28 Tagen Angiotensin II Infusion zeigte sich die diastolische Funktion signifikant beeinträchtigt, dargestellt durch eine vermindertes E'/A' sowie ein erhöhtes E/E'. Die Behandlung mit G-CSF induziert eine Normalisierung der diastolischen Funktion.

### 3.3 qRT-PCR: BNP

Zusätzlich zum echokardiographischen Nachweis einer diastolischen Funktionsstörung wurde der Biomarker BNP bestimmt, der im Rahmen der Herzinsuffizienz als valides Diagnosekriterium gilt. Verwendet wurde isolierte RNA aus dem linksventrikulären Myokard der Versuchstiere. In der qRT-PCR zeigte sich in der mit G-CSF behandelten Gruppe eine signifikant verminderte BNP-Expression (MV= 2,234, SD= 0,7247; p< 0.0105 vs. HFpEF, vs. NaCl 28 Tage) im Vergleich zur HFpEF-Gruppe (MV= 3,984, SD= 1,36) und zur NaCl-Kontroll-Gruppe (MV= 3,75, SD= 0,9954) (Abbildung 3.3).



Abbildung 3.3: qRT-PCR von BNP: Die Abbildung zeigt eine repräsentative Dokumentation der qRT-PCR-Ergebnisse. Die BNP-Expression in der mit G-CSF behandelten Gruppe war im Vergleich zu den mit NaCl behandelten Mäusen sowie zur HFpEF-Gruppe signifikant vermindert. Dargestellt sind die Mittelwerte +/-SD, n(gesamt)=18; Sham=2, G-CSF-28d=8, HFpEF-28d =4, NaCl-28d =4

### 3.4 Der Einfluss von G-CSF auf die myokardiale Fibrose

Basierend auf der Annahme, dass die diastolische Funktionsstörung mit einem erhöhten Kollagenumsatz und konsekutiver Fibrose einhergeht, wurde der totale Kollagengehalt untersucht. Bereits bei lichtmikroskopischer Betrachtung zeigte sich ein verbreitertes Interstitium. Nach immunhistochemischer Picrosirius Red Färbung ließ sich dieses Ergebnis durch eine Zunahme der EZM in den mit NaCl behandelten Tieren zurückführen.

In der mit G-CSF-28d behandelten Gruppe (MV=1,499, SD=0,6623, p=0.0321) zeigte sich hingegen ein signifikant verminderter Gesamtkollagengehalt im Vergleich zur HFpEF-28d-Gruppe und zur NaCl-28d-Gruppe (MV= 3,653, SD= 1,694; NaCl-28d: MV=3,714, SD=0,378). Die histomorphometrisch ermittelten Flächen des Gesamtkollagens wurden in Prozent wiedergegeben (Abbildung 3.4).



Abbildung 3.4: Darstellung des Kollagengehalts in der Picro Sirius Red-Färbung: Myokard (gelb), kollagenreiches Bindegewebe (rot), (obere Abbildung) und Auswertung des immunhistochemischen Nachweises des Gesamtkollagengehalts in der Picrosirius Red Färbung (untere Abbildung). Der Gesamtkollagengehalt in der mit G-CSF behandelten Gruppe als auch der Sham-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe ist signifikant vermindert. Dargestellt sind die Mittelwerte +/-SD, n(gesamt)=17, Sham-28d =4, HFpEF=5, G-CSF-28d=4, NaCl-28d =4. Maßstabsleiste: 50µm

Sham

HFpEF G-CSF-28d NaCI-28d

Im Vergleich der Versuchszeiträume 7-Tage vs. 28-Tage zeigt sich im 28-Tage-Versuchszeitraum ein deutlich verminderter Kollagengehalt innerhalb der G-CSF-Gruppe (mv=1,00) im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe (mv=2,295).

Auch im 14-Tage-Versuchszeitraum ist der Kollagengehalt im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich geringer. Insgesamt wurde eine starke Zunahme des Kollagengehaltes bis zur vierten Woche beobachtet (Abbildung 3.5).





Abbildung 3.5: Zeitverlauf des Kollagengehalts in der Picro Sirius Red-Färbung (obere Abbildung): Myokard (gelb), kollagenreiches Bindegewebe (rot), und die Auswertung (untere Abbildung). Es zeigt sich ein deutlich verminderter Kollagengehalt in der mit G-CSF behandelten Gruppe gegenüber der NaCl-Gruppe. Im Verlauf der Zeit, 7-Tage vs. 28-Tage, nimmt der Kollagengehalt deutlich zu. n(gesamt)=14; NaCl-7d=2, G-CSF-7d=4, NaCl-28d=4, G-CSF-28d=4

## 3.5 Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen-I

Auch in der immunhistochemischen Färbung von Kollagen I zeigte sich ein signifikant verminderter Kollagengehalt innerhalb der G-CSF-28d-Gruppe (MV= 3,437, SD=0,8331, p=0.0441) im Vergleich zur Kontrollgruppe (MV=8,274, SD=1,887), und ein deutlich erhöhter Kollagengehalt in der Sham-Gruppe im Vergleich zu den mit G-CSF behandelten Tieren.

Dieser histologische Befund entspricht der auch in der Picrosirius Red Färbung dargestellten Verminderung der Fibrose in der mit G-CSF behandelten Gruppe (Abbildung 3.4).



Abbildung 3.6: Auswertung des Kollagen-I-Gehalts nach immunhistochemischer Färbung. Der Kollagen I-Gehalt ist in der G-CSF-Gruppe im Vergleich zur NaCl-Gruppe signifikant und zur Sham-Gruppe deutlich vermindert. Dargestellt sind die Mittelwerte +/-SD, n(gesamt)=14, Sham=4, G-CSF-28d=6, NaCl-28d=4

## 3.6 Western Blot Kollagen-I

Unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers wurde die Proteinmenge von Kollagen-I im 28-Tage-Versuchszeitraum im Western-Blot untersucht. Die bei 131 kDa detektierten Banden wurden für die Auswertung verwendet. Hier zeigte sich ein erhöhter Kollagen-I Proteingehalt in der HFpEF- Gruppe.

Nach der der Behandlung mit G-CSF erreicht der Kollagen-I Gehalt nahezu den Ausgangswert (Abbildung 3.7). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbung des Gesamtkollagengehalts in der Picrosirius Red Färbung.



Abbildung 3.7: Western Blot Kollagen-I

Der Kollagen-I-Proteingehalt war in der HFpEF- Gruppe sowie in der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe im Vergleich zu den mit G-CSF behandelten Tieren im 28-Tage-Versuchszeitraum deutlich erhöht. Dargestellt sind die Mittelwerte +/-SD

## 3.7 Der Einfluss von G-CSF auf Entzündungsprozesse

Der Frage nachgehend, ob es durch den Einsatz von G-CSF zu einer verstärkten Einwanderung von Neutrophilen Granulozyten und Monozyten kommt, die durch Expressions- und Produktionssteigerung pro-inflammatorischer Entzündungsmediatoren die Zusammensetzung der EZM beeinflussen und somit zur Verbesserung der kardialen Parameter beitragen, wurde das Gewebe der Versuchstiere immunhistologisch untersucht. Das Glykoprotein CD68 (Cluster of Differentiation 68) bindet intrazellulär an low-density-Lipoproteine von Makrophagen und Monozyten und wurde daher als Makrophagen/Monozyten-Marker verwendet. Für die Darstellung von Neutrophilen Granulozyten wurde der monoklonale anti-mouse Antikörper NIMP-R14 verwendet.

Die immunhistochemische Detektion von Monozyten und Neutrophilen Granulozyten im Myokard, dargestellt als Färbung CD68- oder NIMP-R14-positiver Zellen, zeigte in beiden Versuchszeiträumen keine wesentlichen Unterschiede in der Zellanzahl, und somit auch keine Unterschiede hinsichtlich der Entzündungsaktivität. Der Einsatz von G-CSF führte weder im 7-Tage noch im 28-Tage-Versuchszeitraum zu einer verstärkten Einwanderung von Monozyten oder Neutrophilen Granulozyten (vgl. Abbildung 3.8, Abbildung 3.9).



Abbildung 3.8: Immunfärbung von CD68 und NIMP-R14 und Auswertung. Immunfärbung des Gewebsmakrophagenmarkers CD68 (rot) in der oberen Reihe, sowie des Neutrophilen Granulozytenmarkers NIMP R14 (rot) in der unteren Reihe.



Abbildung 3.9: Im Vergleich der Zeiträume 7-Tage vs. 28-Tage zeigen sich weder in den mit G-CSF behandelten Gruppen noch in den NaCl-Kontrollgruppen signifikante Unterschiede hinsichtlich der Anzahl markierter Zellen; Kernfärbung mit DAPI (blau), Dargestellt sind die Mittelwerte +/-SEM. n (NIMP gesamt) =12, NaCl-7d=2, G-CSF-7d=4, NaCl-28d=2, G-CSF-28d=4;

n (CD68 gesamt) =12, NaCl-7d=2, G-CSF-7d=4, NaCl-28d=2, G-CSF-28d=4.

## 3.8 G-CSF und die klassischen Inflammations-Zytokine

Im Rahmen der Fragestellung, inwiefern sich die Gabe von G-CSF auf die Expression klassischer Inflammationstargets auswirkt, die normalerweise im Rahmen der HFpEF hochreguliert sind, wurden mittels qRT-PCR die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , II-6, II-18, IIL-10, CLL-2 und TNF- $\alpha$  untersucht (s. Abbildung 3.10. Hier zeigte sich kein richtungsweisender Unterschied im Expressionslevel der 7- und 28-Tage- Gruppen.



Abbildung 3.10:qRT-PCR der klassischen Inflammationstargets IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-18, CCL-2 (MPC-1), TNF- $\alpha$  aus den zwei Versuchszeiträumen 7-Tage vs. 28-Tage.

In der Zusammenschau der Ergebnisse zeigt sich in Bezug auf das inflammatorische Geschehen keine signifikante Einwanderung inflammatorischer Zellen in das myokardiale Gewebe und keine konsekutive Aktivierung der klassischen Entzündungskaskade. Auch in der qRT-PCR lässt sich molekularbiologisch keine signifikante Expressionssteigerung klassischer Inflammationsmarker beobachten.

## 3.9 G-CSF und die Inflammationstargets Lactoferrin und Cathelicidin

Neben oben erwähnten Mediatoren der klassischen Entzündungsreaktion wurden zwei weitere Inflammationstargets untersucht, Lactoferrin und Cathelicidin.

Von beiden Zytokinen ist bekannt, dass sie einen direkten inhibitorischen Effekt auf die Kollagensynthese ausüben und darüber hinaus einen wichtigen immunmodulatorischen Einfluss besitzen. In der qRT-PCR des Inflammationstargets Cathelicidin zeigt sich in der mit G-CSF-28d (MV= 9,91, SD=4,458, p=0.0027) behandelten Gruppe ein signifikant höheres Expressionsprofil im Vergleich zur NaCl-28d-Gruppe (MV= 0,8241, SD=0,6772).

Auch das Zytokin Lactoferrin war in der G-CSF-28d-Gruppe (MV= 23,60, SD= 17,89, p= 0.0153) in der qRT-PCR im Vergleich zur NaCl-Kontroll-Gruppe (MV= 1,190, SD=0,3783) signifikant höher exprimiert (Abbildung 3.11).



Abbildung 3.11: qRT-PCR von Cathelicidin und Lactoferrin im 28-Tage-Versuchszeitraum; die Menge der mRNA-Transkripte wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Es zeigt sich eine signifikant erhöhte Expression der beiden Inflammationstargets im Vergleich zur Sham- und NaCl-Kontrollgruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte +/-SD.

n (CAMP gesamt) =13, Sham=3, G-CSF-28d=6; NaCl-28d=4.

n (LTF gesamt) =16, Sham=3, G-CSF-28d=8; NaCl-28d=5.

Im Vergleich der beiden Versuchszeiträume zeigten sich in der qRT-PCR von Cathelicidin und Lactoferrin in den mit G-CSF behandelten Mausgruppen eine verstärkte Expression gegenüber den NaCl-Kontrollgruppen. Sowohl in der 7-Tage-G-CSF-Gruppe war die Expression von Cathelicidin (MV=3,697; SD=3,233) als auch die von Lactoferrin (MV=13,77; SD=11,37) gegenüber der NaCl-Gruppe deutlich erhöht (Cathelicidin MV=0,722; SD=0,875; Lactoferrin MV=3,2; SD=5,298).

Der gleiche Trend ließ sich auch im längeren Versuchszeitraum von 28 Tagen beobachten, in dem das Expressionsprofil in der G-CSF-Gruppe von Cathelicidin (MV=4,48; SD=5,172) und Lactoferrin (MV=12,96; SD=13,94) gegenüber der NaCl-Kontrollgruppe (Cathelicidin MV=0,659; SD=0,693; Lactoferrin MV=2,472; SD=3,834) ebenfalls erhöht war (Abbildung 3.12).



Abbildung 3.12: qRT-PCR von Cathelicidin (CAMP) links, und Lactoferrin (LTF) rechts im Zeitverlauf. Die Menge der mRNA-Transkripte wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Es zeigt sich eine deutlich erhöhte Cathelicidin-Expression innerhalb der mit G-CSF behandelten Gruppen, sowohl im kürzeren 7-Tage- als auch im langen 28-Tage-Versuchszeitraum.

Ein ähnlicher Trend lässt sich auch im Expressionsprofil von Lactoferrin beobachten, hier kommt es ebenfalls zu einer erhöhten LTF-Expression in den mit G-CSF behandelten Gruppen im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte +/-SD.

n (CAMP gesamt) =29, wt=3, NaCl-7d=6, G-CSF-7d=8, NaCl-28d=4, G-CSF-28d=8 n (LTF gesamt) =29, wt=2, NaCl-7d=6, G-CSF-7d=8, NaCl-28d=5, G-CSF-28d=8.

## 3.10 G-CSF und Gap Junction Remodeling

## 3.10.1 Connexin-43

Der Frage nachgehend, ob sich die Gabe von G-CSF positiv auf die elektromechanische Kopplung im Rahmen der diastolischen Funktionsstörung auswirkt, wurde das Gap Junction Protein Connexin-43 im Western Blotting untersucht. Die bei 43 kDa detektierten Banden wurden für die densitometrische Auswertung verwendet. Hier zeigte sich ein signifikant erhöhter Connexin-43-Proteingehalt in der 7-Tage-G-CSF- Gruppe im Vergleich zur 7-Tage-NaCl-Kontroll-Gruppe sowie zur 7-Tage-HFpEF-Gruppe (Abbildung 3.13).



Abbildung 3.13: Western Blot Connexin-43.

Der Connexin-43-Proteingehalt war in der HFpEF- Gruppe deutlich vermindert. Die Gabe von G-CSF führt zu einem signifikant verstärkten Proteingehalt im Vergleich zur HFpEF- und NaCl-Gruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte, bezogen auf GAPDH, +/-SD.

Auch im Rahmen der Untersuchung des zeitlichen Verlaufs des Proteingehalts Connexin-43 zeigte sich im Westen Blot ein signifikant höherer Connexin-43-Proteingehalt in der 7-Tage G-CSF Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch im längeren Versuchszeitraum zeigt sich in der 28-Tage G-CSF Gruppe ein höher Proteingehalt als in der NaCl-Gruppe (s. Abbildung 3.14).



Abbildung 3.14: Western Blot Connexin-43 im Zeitverlauf

Der Connexin-43-Proteingehalt war in der 7-Tage-G-CSF-Gruppe im Vergleich zur 7-Tage-NaCl-Gruppe signifikant erhöht. Auch im längeren Versuchszeitraum von 28 Tagen war der Connexin-43-Gehalt in der G-CSF-Gruppe Western Blot Connexin-43 im Zeitverlauf: Der Connexin-43-Proteingehalt war in der 7-Tage-G-CSF-Gruppe im Vergleich zur 7-Tage-NaCl-Gruppe signifikant erhöht.

Dargestellt sind die Mittelwerte +/-SD. n (Con43 gesamt) =24, Sham=3, NaCl-7d=5, G-CSF-7d=5, NaCl-28d=5, G-CSF-28d=6.

### **3.10.2** β-Catenin

Um zu überprüfen, über welche möglichen Mediatoren G-CSF auf den Proteingehalt von Connexin-43 wirkt, wurde das Struktur-Protein  $\beta$ -Catenin untersucht, da die Connexin-Expression für gewöhnlich über den  $\beta$ -Catenin-Pfad reguliert wird.  $\beta$ -Catenin ist als Mediator der Connexin-43-Regulation somit von Wichtigkeit für die elektromechanische Kopplung im Herzen. Die Ergebnisse im Western Blot zeigten, dass G-CSF den Connexin-43-Proteingehalt über den  $\beta$ -Catenin -Pfad zu erhöhen scheint, da nach Gabe von G-CSF auch der  $\beta$ -Catenin -Proteingehalt signifikant erhöht war. Die Bande auf der Nitrozellulose bei 86kDa wurde unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers (s. Tabelle 12.6), der an dieser Stelle auf der Nitrozellulose bindet, mithilfe des Molekulargewichtsstandards als  $\beta$ -Catenin -Bande identifiziert.

Die Ergebnisse dieser quantitativen Messungen sind in den folgenden beiden Abbildungen dargestellt (s. Abbildung 3.15, Abbildung 3.16).

Abbildung 3.15: Western Blot β-Catenin

Der  $\beta$ -Catenin -Proteingehalt war in der 28-Tage-G-CSF-Gruppe im Vergleich zur 28-Tage-NaCl-Gruppe signifikant erhöht.





Abbildung 3.16: Western Blot β-Catenin im Zeitvergleich

Auch im Vergleich der beiden Versuchszeiträume war der  $\beta$ -Catenin -Gehalt in der mit G-CSF behandelten Gruppe signifikant erhöht. Dargestellt sind Mittelwerte +/-SD und unten repräsentative Banden aus den aufgezeigten Gruppen.

n (β-Catenin gesamt) =20. NaCl-7d=5, G-CSF-7d=5, NaCl-28d=5, G-CSF-28d=5.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die Gabe von G-CSF signifikant auf den Proteingehalt des wichtigsten Gap Junction Proteins Connexin-43 im Rahmen der diastolischen Funktionsstörung im Mausmodell auswirkt.

Dieser Effekt scheint durch die bei G-CSF-Verabreichung ebenfalls kohärent erhöhte Proteinmenge des wichtigsten Modifikation-Proteins  $\beta$ -Catenin bedingt zu sein.

## 4. Diskussion

## 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die kontinuierliche Applikation von niedrig dosiertem Angiotensin II an einem Mausmodell zu einer diastolischen Funktionsstörung führt, und mit erhöhter myokardialer Fibrose einhergeht. Die Gabe von G-CSF führt zu einem Rückgang der myokardialen Fibrose und damit zu einer Normalisierung diastolischer Funktionsparameter.

Diese Reduktion der Fibrose wird durch eine immunhistochemisch und molekularbiologisch Verminderung des Kollagengehalts nachgewiesen. Weiterhin kann angenommen werden, dass es in dem low-dose-AT II-Tiermodell wahrscheinlich nicht zur Aktivierung der klassischen akuten Entzündungskaskade kommt, und die Verbesserung kardialer Funktionsparameter somit nicht durch die Regulation klassischer Inflammationsparameter bedingt ist. In den mit G-CSF behandelten Tieren sind dennoch die immunmodulatorischen Zytokine Cathelicidin und Lactoferrin signifikant hochreguliert.

Zudem wird die Verbesserung diastolischer Funktionsparameter in den mit G-CSFbehandelten Tieren von einem erhöhtem Connexin-43- und  $\beta$ -Catenin -Proteingehalt begleitet. Der erhöhte Connexin-43-Proteingehalt scheint durch das ebenfalls erhöhte Strukturprotein  $\beta$ -Catenin bedingt.

Somit führt die durch G-CSF verminderte Kollagenablagerung zu einer verbesserten Überleitung elektrischer Reize und zu einer Verbesserung der elektromechanischen Kopplung und myokardialen Kontraktion. G-CSF könnte sich als potenzieller therapeutischer Wirkstoff zur Prävention von Arrhythmien und kontraktiler Dysfunktion bei diastolischer Herzinsuffizienz eignen.

## 4.2 Effizienz des Tiermodells

Die verwendete subkutane Implantationsprozedur ermöglichte ein zügiges und komplikationsloses Einbringen der Pumpe unter die Haut der Maus. Durch tägliche Kontrolle der Wundverhältnisse wurde der Gesundheitsstatus der Tiere überwacht. Das Tiermodell zeichnete sich durch eine niedrige Mortalität aus, lediglich ein Tier verstarb im postinterventionellen Verlauf. Die Implantation einer osmotischer Minipumpen ermöglicht in Bezug auf die Kontrollierbarkeit des Stimulus eine konstante Applikation von Angiotensin II über den gesamten Versuchszeitraum.

Die diastolische Funktionsstörung des linken Ventrikels sowie die Entstehung der HFpEF verlaufen in nicht immer klar voneinander abgrenzbaren Stadien, daher wurde ein früher (7 Tage) sowie ein später Untersuchungszeitpunkt (28 Tage) gewählt.

Entsprechend der Empfehlung der europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) stellt der Parameter E/E<sup> $\prime$ </sup> einen zentralen Parameter für die Diagnose der diastolischen Dysfunktion dar [79]. Als verlässlicher Marker einer manifesten diastolischen Funktionsstörung konnte, analog zur echokardiographischen Untersuchung beim Menschen, auch im Mausmodell das Verhältnis des passiven frühdiastolischen Einstroms im Mitraleinstromeinstromprofil (E) zur dopplerechokardiographisch bestimmten passiven Füllung des Ventrikels (E<sup> $\prime$ </sup>) validiert werden. In der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe zeigte sich im Vergleich zur G-CSF-Gruppe eine signifikante Beeinträchtigung der beiden Parameter E<sup> $\prime$ </sup>/A<sup> $\prime$ </sup> und E/E<sup> $\prime$ </sup> (Abbildung 3.2).

Die linksventrikuläre systolische Funktion, dargestellt durch die Bestimmung der linksventrikulären Ejektionsfraktion zeigte demgegenüber keine signifikanten Veränderungen (Abbildung 3.1). Somit eignet sich das Mausmodell einer niedrigdosierten Angiotensin-II Infusion, um eine diastolische Funktionsstörung mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion zu simulieren.

Zusätzlich zum echokardiographischen Nachweis einer diastolischen Funktionsstörung wurde die Expression von BNP bestimmt, die sich im Rahmen der diastolischen Herzinsuffizienz als valides Diagnosekriterium etabliert hat, da in Folge einer erhöhten Wandspannung durch die Kardiomyozyten vermehrt proBNP synthetisiert wird [34,79,122]. Aufgrund des geringen zur Verfügung stehenden Versuchsmaterials erfolgte ein indirekter Nachweis über die BNP-Expression im murinen Myokard in der qRT-PCR.

Hier zeigte sich in der qRT-PCR in der mit G-CSF behandelten Gruppe eine signifikante Verminderung der BNP-Expression (vgl. Abbildung 3.3).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Regan und Toldo, die ebenfalls durch die Implantation einer subkutanen osmotischen Angiotensin II-Pumpe in Mäusen eine diastolische Herzinsuffizienz induzierten, zeigte sich auch in dem von uns verwendeten Mausmodell, dass niedrigdosierte Angiotensin II-Infusion zum kardialen Phänotyp einer diastolischen Funktionsstörung mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion führt [88,104]. Die Effizienz des hier verwendeten Tiermodells hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wird durch eine Studie bekräftigt, die unterschiedliche Mausmodelle zur Generierung einer diastolischen Dysfunktion untersuchten und feststellen konnten, dass die subkutane Applikation von Angiotensin II zur Ausbildung einer diastolischen Dysfunktion führt [38].

Natürlich gelten für die Ergebnisse der vorliegenden Studie auch gewisse Einschränkungen.

Die Sham-Mäuse wurden nicht sequenziell echokardiographiert. Es ist jedoch nicht anzunehmen, dass die Prozedur der Sham-OP einen Einfluss auf die Ejektionsfraktion hat, da es sich bei der subkutanen Implantation der osmotischen Angiotensin II-Pumpen um einen minimal-invasiven Eingriff handelt. Die Arbeitsgruppe um Regan et al. konnte in ihrer Arbeit zur Untersuchung eines durch chronische Angiotensin II-Infusion induzierten HFpEF-Mausmodells zeigen, dass es durch die Applikation von ATII nicht zur Veränderung linksventrikulärer Parameter kommt [88].

Des Weiteren wurden nur junge C57Bl6-Wildtyp-Mäuse verwendet. Für künftige Studien sollten im Tiermodell sowohl männliche und weibliche als auch ältere Tiere verwendet werden, um die Auswirkungen auf alters- und geschlechtsabhängige Adaptationsprozesse zu untersuchen. Hinsichtlich des Geschlechtsaspekts wird angemerkt, dass die diastolische Funktionsstörung vorwiegend bei Frauen auftritt [33,107]. Folglich wäre es interessant, das Tiermodell auf verschiedene Altersgruppen weiblicher Mäuse (bspw. prä-/postmenopausal) anzuwenden.

Es wurden nur zwei Versuchszeiträume (7-Tage vs. 28-Tage) berücksichtigt. In weiteren Studien könnte untersucht werden, inwiefern sich eine längere Infusionsdauer, sowie eine höhere vs. niedrigere ATII-Dosierung auf den Schweregrad der Erkrankung auswirkt. Insbesondere im Rückblick auf Inflammationsprozesse und strukturelle Veränderungen in der Architektur des Bindegewebes sowie Veränderungen der Zell-Zell-Synchronisation spielt der Zeitfaktor eine entscheidende Rolle. Über den 7- vs. 28-Tage-Untersuchungszeitpunkt hinausgehende Analysen könnten neue Erkenntnisse über die Pathogenese der HFpEF liefern.

In der Zusammenschau induziert die niedrigdosierte ATII Infusion im Tiermodell eine diastolische Funktionsstörung. Das Modell eignet sich somit zur molekularbiologischen und immunhistochemischen Untersuchung von Mechanismen, die in der Pathogenese der diastolischen Funktionsstörung eine maßgebliche Rolle spielen, und bietet somit auch die Möglichkeit, nach kurativen und regenerativen Therapieansätzen der diastolischen Herzinsuffizienz zu suchen.

#### 4.3 G-CSF und die Wirkung auf den Metabolismus der extrazellulären Matrix

Die Haupterkenntnis dieser Arbeit ist der Nachweis, dass sich der Einsatz von G-CSF im Mausmodell über eine Verminderung des myokardialen Fibrosegehalts positiv auf das kardiale Remodeling auswirkt und somit zu einer Funktionsverbesserung kardialer Parameter führt. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits in vorliegenden Arbeiten zeigen, dass G-CSF im TAC-Mausmodell zur Reduktion der Fibrose beiträgt und somit zur Normalisierung kardialer Funktionsparameter führt [100]. Dies ist insofern bedeutsam, als ein erhöhte EZM-Metabolismus und eine verminderte Degradation von Kollagenen zu vermehrter mechanischer Steifheit im Myokard und zu diastolischer Dysfunktion führen [15,28].

G-CSF führte über eine Verminderung des Gesamtkollagengehalt und Kollagen-I-Proteingehalts, dargestellt sowohl in der immunhistochemischen Picrosirius Red Färbung als auch molekularbiologisch im Western Blotting, zu einem verminderten fibrotischen Umbau des Bindegewebes und damit zu einem verminderten myokardialen Remodeling. Diese Erkenntnisse decken sich mit Untersuchungen um die Arbeitsgruppe Martos et al, die ebenfalls einen engen Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der diastolischen Dysfunktion und erhöhtem Level an Markern des Kollagen-Metabolismus aufzeigten [64]. Hinsichtlich der Verteilung der Fibrose im Myokard in diesem Tiermodell kann angenommen werden, dass sich in der frühen Phase des kardialen Remodelings sowohl perivaskuläre Fibrose als auch "Reaktive Fibrose" gebildet haben, die sich in der Progredienz der HFpEF von den Gefäßen bis hin zum Interstitium und rund um die Muskelfasern ausbreiteten [43].

Die histologisch sowie im Western Blot dargestellten Veränderungen von Kollagen-I dürften hinsichtlich der Pathogenese der diastolischen Funktionsstörung eine bedeutendere Rolle spielen als jene durch Kollagen-III, da Kollagen-I eine höhere Steifheit aufweist, einen größeren Anteil am Gesamtkollagen ausmacht und folglich zu größeren Teilen das myokardiale Remodeling als Antwort auf Drucküberlastung konstituiert [116,126]. Ergebnisse anderer Arbeiten lassen den Schluss zu, dass sich die durch Kardiomyozyten bedingten Veränderungen der myokardialen Steifigkeit in der frühen Phase der Pathogenese manifestieren, wohingegen Veränderungen der Extrazellulären Matrix eher in fortgeschrittenen Phasen der Erkrankung auftreten [23]. Kollagene sind zwar stabile Strukturproteine, haben allerdings einen langsamen Metabolismus von 80-120 Tagen [59]. Dies könnte das Ergebnis dieser Arbeit erklären, dass der Gesamtkollagengehalt in der Picrosirius Red-Färbung im kürzeren 7-Tage-Versuchszeitraum im Vergleich zur G-CSF-Gruppe zwar deutlich, nicht aber signifikant verringert war.

Hinsichtlich der gewählten Methodik, der Darstellung des Gesamtkollagengehalts in der Picrosirius Red-Färbung, ist anzumerken, dass diese immunhistochemische Darstellung der Kardiomyozyten nur ein zweidimensionales Bild einer eigentlich dreidimensionalen Zelle darstellen kann. Somit kann die Darstellung des Gesamtkollagengehalts immer nur als Annäherung verstanden werden [8].

Natürlich stellt die beeinträchtigte Relaxation durch einen erhöhten Fibrosegrad nur einen Aspekt in der Pathogenese der HFpEF dar. Untersuchungen der individuellen Steifheit von Kardiomyozyten, also Veränderungen der Titin-Isoform Expression und des Titin-Phosphorylierungsstatus, wurden nicht durchgeführt [23,74]. Auch die Auswirkungen auf Bestandteile der Calcium-Homöostase im Rahmen der Pathogenese der diastolischen Funktionsstörung wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Folglich erfordern die Auswirkungen von niedrig dosiertem ATII auf die konstituierenden Parameter der Steifheit von Kardiomyozyten sowie auf den Calcium-Haushalt weitere Untersuchungen. Weitere serologische Biomarker, die Veränderungen der Kollagenhomöostase sowie das Vorliegen myokardialer Fibrose widerspiegeln, könnten bestimmt werden. Hier wären neben den den Kollagengehalt reflektierenden Biomarkern PINP, PIIINP und CITP noch die für den Matrix-Umbau und Abbau repräsentativen Marker MMPs und TIMPs noch Galectin-3 und ST-2 zu erwähnen, die mit dem allgemeinen Ausmaß und dem Schweregrad der Fibrose korrelieren [64,126].

Zusammenfassend bestätigen unsere Ergebnisse somit die herausragende Bedeutung des bindegewebsartigen Umbaus des Myokards durch Veränderungen in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix bei der Pathogenese der diastolischen Funktionsstörung. Des Weiteren wird ersichtlich, dass eine Reduktion des Fibrosegehalts der Ventrikel, charakterisiert durch eine Verminderung des Gesamtkollagengehalts, mit einer Verbesserung der diastolischen Funktion einhergeht. Zudem lässt sich aus den Ergebnissen ableiten, dass eine Reduktion der Fibrose eine mögliche therapeutische Strategie zur Behandlung der diastolischen Funktionsstörung darstellen könnte.
#### 4.4 Der Einfluss G-CSF auf das inflammatorische Geschehen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob und inwiefern der Einsatz von G-CSF das Inflammationsgeschehen bedingt, und somit zu Veränderungen der extrazellulären Matrix führt. Frühere Arbeiten dieser Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass G-CSF im TAC-Mausmodell zu einer signifikanten Einwanderung Neutrophiler Granulozyten und einer konsekutiv signifikanten Hochregulation von IL-1 $\beta$  führt (vgl. [100]). Immunhistochemisch zeigte sich die Anzahl von Neutrophilen Granulozyten und Makrophagen/Monozyten nicht erhöht. Auch die klassischen Inflammationsparameter (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-18, CCL-2, TNF- $\alpha$ ), die für gewöhnlich im Rahmen der akuten Entzündungsphase hochreguliert sind [31], zeigen sich in unseren Daten nicht stärker exprimiert.

An dieser Stelle scheint die Frage berechtigt, ob in diesem Modell (low-dose ATII) die akute Einwanderung von inflammatorischen Zellen, insbesondere Monozyten und die konsekutive Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine und profibrotischer Faktoren überhaupt nachgewiesen werden können, und ob nicht andere Mechanismen initiiert werden. Der Stimulus durch niedrig dosiertes Angiotensin II induziert andere Signalkaskaden als beispielsweise jener durch transaortale Konstriktion (TAC) induzierten Überdruckbelastung und konsekutiver kardialer Hypertrophie. Kai et al. konnten in ihrem Tiermodell (Ratten, chronische Überdruckbelastung durch suprarenale Aortenkonstriktion) zeigen, dass es im Rahmen des späten moykardialen Remodeling zu einer Abnahme der Monozyten kommt, die Menge der Fibrose im Verlauf der Zeit aber eklatant ansteigt [43]. Das Eindringen von Monozyten/ Makrophagen in das Myokard im Rahmen der Entwicklung einer diastolischen Funktionsstörung ist wahrscheinlich ein wesentlich milderes, aber ebenso vorübergehendes Ereignis.

Diese Hypothese stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein, da es in unseren Experimenten nicht zu einer gesteigerten Expression inflammatorischer Zytokine kommt, die von eingewanderten Monozyten/ Makrophagen sezerniert werden und damit auch nachweisbar sein müssten (vgl. Abbildung 3.10). Auch hinsichtlich der Wirkung von G-CSF auf inflammatorische Prozesse spielt der Zeitfaktor eine entscheidende Rolle. Untersuchung der Arbeitsgruppe um Boneberg konnten zeigen, dass es durch die Gabe von G-CSF zwar zu einer Erhöhung der zirkulierenden Neutrophilen sowie zur Monozytose kam, diese sich jedoch zeitlich sehr früh (nach 8 bzw. 24h) abspielten [10].

#### 4.5 G-CSF und die Inflammationstargets CAMP und LTF

Interessant ist daher, dass die Expression beider Inflammationstarget Lactoferrin und Cathelicidin in der mit G-CSF behandelten Gruppe im Vergleich zur sham- und NaCl-Gruppe signifikant hochreguliert war (vgl. Abbildung 3.11). Auch im Vergleich beider Versuchszeiträume (7-Tage vs. 28-Tage) war die Tendenz ähnlich.

In den mit G-CSF behandelten Gruppen war das Expressionsprofil der beiden Parameter deutlich verstärkt. Diese Ergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen der Arbeitsgruppe um Kumagi et al., die beobachteten, dass die CAMP-Expression im Herzen während der Entzündungs- und Erholungsphase in einem Autoimmunmyokarditis-Modell signifikant erhöht war. Die Folgen dieser erhöhten CAMP-Expression waren die Aktivierung der purinergen P2X7-Rezeptorkaskade und eine konsekutive Verminderung kardialer Fibroblasten [52]. Fibroblasten sind einer der häufigsten Vertreter der Nicht-Kardiomyozyten im Myokard, und ihre Einwanderung ist eng an die Fibroseentstehung gekoppelt. Sie sind somit einer der wichtigsten Akteure in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen [57].

In diesem Kontext ist bemerkenswert, dass Cathelicidin, ähnlich wie die klassischen Inflammationszytokine TNF- $\alpha$ , IL-6, etc., normalerweise zu Beginn einer Inflammation parallel zur Einwanderung von Neutrophilen sezerniert wird. Cathelicidin wird von emigrierten Neutrophilen freigesetzt und dann entlang des Endotheliums transportiert und Leukozyten präsentiert [114]. Auch Bournazou konnte zeigen, dass apoptotische Granulozyten in der Lage sind, die Immunreaktion durch Freisetzung von Mediatoren wie Lactoferrin abzuschwächen und damit eine weitere Rekrutierung von Granulozyten zu verhindern [14].

In der Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit zeigt sich, dass im vorliegenden Mausmodell in beiden Versuchszeiträumen die akute Entzündungsreaktion, ausgedrückt als Immigration von Neutrophilen und Monozyten sowie verstärkte Sekretion immunmodulatorischer Zytokine, nicht mehr nachweisbar und somit wahrscheinlich bereits beendet zu sein scheint. Das Expressionsniveau beider Proteine CAMP und Lactoferrin war aber dennoch erhöht, was für eine über die akute Inflammationsreaktion hinausgehende Wirkung zu sprechen scheint. Diese Erkenntnis deckt sich ebenfalls mit

den Ergebnissen von Kumagai et al., bei denen im experimentellen Autoimmunmyokarditis-Modell Expression CAMP während die von der Inflammationsphase am stärksten hochreguliert war, diese Hochregulierung aber auch während der Erholungsphase noch erhalten blieb.

Einen möglichen Mechanismus zur Verbesserung kardialer Parameter durch den Einsatz von G-CSF durch Reduktion der kardialen Fibrose könnte somit die permanente Hochregulation von CAMP und die konsekutive verminderte Einwanderung kardialer Fibroblasten darstellen. Diese Einwanderung von Fibroblasten sowie eine mögliche Differenzierung könnte in einer weiteren Studie immunhistochemisch untersucht werden.

In der Zusammenschau der Wirkungsaspekte von G-CSF auf das inflammatorische Geschehen konnten wir zeigen, dass sich der Einsatz von G-CSF in beiden Versuchszeiträumen nicht auf die klassischen Inflammationsparameter auszuwirken scheint, die beiden Targets LTF und CAMP aber eine signifikant erhöhte Expressionsrate aufweisen. Parallel dazu zeigte sich der Fibrosegehalt in der mit G-CSF behandelten Gruppe signifikant vermindert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen damit im Einklang mit anderen Arbeiten, die zeigen konnten, dass CAMP ein mögliches Ziel für Therapieansätze zur Vorbeugung und Verhinderung kardialer Fibrose im Rahmen des Inflammations- und konsekutiven Remodeling-Prozesses bei HFpEF darstellt. Hinsichtlich der Wirkung von Lactoferrin im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen scheint es aktuell nur wenige Studien zu geben [71]. Folglich könnten sich CAMP und LTF einerseits als neue Inflammationsparameter etablieren, und andererseits, im Gegensatz zu den klassischen Zytokinen, einen bisher unerforschten Mechanismus repräsentieren, der im Rahmen der fortschreitenden diastolischen Funktionsstörung abläuft.

In der Zusammenschau lassen die verschiedenen Untersuchungsergebnisse den Schluss zu, dass der therapeutische Nutzen von G-CSF aufgrund der heterogenen zellulären und molekularen Effekte noch nicht abschließend geklärt ist. Insbesondere der Einsatz von G-CSF im Rahmen der diastolischen Herzinsuffizienz ist noch nicht ausreichend untersucht worden.

#### 4.6 Der Einfluss von G-CSF auf Parameter der elektromechanischen Kopplung

#### 4.6.1 Connexin-43

Neben Untersuchungen zu möglichen Wirkungsaspekten von G-CSF hinsichtlich des EZM-Metabolismus und des inflammatorischen Geschehens wurde der Einfluss von G-CSF auf die intraventrikuläre elektromechanische Kopplung untersucht. Der plötzliche Herztod (Sudden cardiac deatch, SCD) ist für bis zu 40% der kardiovaskulären Todesfälle bei HFpEF-Patienten verantwortlich [125].

Die ventrikuläre Arrhythmie, eine der Hauptrisikofaktoren des plötzlichen Herztods, resultiert aus einer progredienten Verlangsamung der Übertragung von elektrischen Impulsen. Diese Beeinträchtigung der Zell-Zell-Kommunikation können durch eine verstärkte interstitielle Fibrose sowie durch Beeinträchtigungen in der Beschaffenheit der Gap Junctions bedingt sein [82,115]. Die Verteilung, Größe und Struktur der Gap Junctions und ihres wichtigsten Proteins Connexin-43 sind für die interzelluläre Leitfähigkeit und damit für die mechanische Effizienz der Kontraktionsfähigkeit unerlässlich. Eine Erhöhung des Angiotensin-II-Spiegels, wie beispielsweise im Rahmen der Herzinsuffizienz, geht mit einer hohen Rate an ventrikulären Tachykardien und plötzlichem Herztod einher. Auf zellulärer Ebene lässt sich eine verminderte Connexin-43-Expression und beeinträchtige Kopplung der Gap Junctions in den Kardiomyozyten beobachten [95]. Zahlreiche Untersuchungen, die sich mit den direkten Effekten von G-CSF auf das Myokard beschäftigten, konnten zeigen, dass G-CSF präventiv auf die Entstehung von ventrikulären Arrhythmien und Herzinsuffizienz nach akutem Herzinfarkt wirkt [35,45].

Eine Hypothese der hier vorliegenden Arbeit bestand in der Annahme, dass sich der Einsatz von G-CSF auf den Proteingehalt des wichtigsten Gap Junction -Proteins, dem Protein Connexin-43, auswirkt und durch eine erhöhte Zell-Zell-Kommunikation zu einer Besserung der elektromechanischen Kopplung führt. Da Connexin-43 das wichtigste Connexin des arbeitenden Myokards ist, geht jede Veränderung des Proteingehalts oder der Verteilung mit einer gestörten Fortleitungsgeschwindigkeit einher.

Der Nachweis eines signifikant erhöhten Proteingehalts in der mit G-CSF behandelten Gruppe gelang mittels Western Blotting (vgl. Abbildung 3.13). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Kuhlmann et al, die durch den Einsatz von G-CSF in einem Infarktmodell eine verminderte Induktion ventrikulärer Arrhythmien nachweisen konnte, und diesen antiarrhythmischen Effekt auf eine verstärkte Expression von Connexin-43 in Kardiomyozyten zurückführte [54].

Die Tatsache, dass der Connexin-43-Proteingehalt in der 7-Tage-G-CSF Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht war, sich im längeren Versuchszeitraum (28 Tage) aber nur noch eine tendenzielle Erhöhung nachweisen ließ, stimmt mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein. So konnten Fontes et al. zeigen, dass der Proteingehalt sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene im Laufe der Zeit (1 vs. 2 vs. 3 vs. 4 Wochen) abnahm, und eine Reduktion des Gap Junction Proteins Connexin-43 dem Auftreten von Fibrose vorausgeht [21]. Die Erkenntnisse der Arbeitsgruppe um Fontes decken sich mit unseren Ergebnissen, und legen die Vermutung nahe, dass G-CSF im Rahmen der diastolischen Funktionsstörung über eine Erhöhung des Gap Junction Proteins Connexin-43 nicht nur präventiv auf die Entstehung des elektromechanischen Remodeling einwirkt, sondern im längeren Verlauf das nachfolgende Auftreten von Fibrose abschwächt.

#### 4.6.2 Nachweis der Connexin-43-Erhöhung über β-Catenin

Um zu überprüfen, über welche möglichen Mediatoren G-CSF auf den Proteingehalt von Connexin-43 wirkt, wurde das Struktur- und Ankerprotein  $\beta$ -Catenin untersucht.

 $\beta$ -Catenin ist ebenfalls Bestandteil der Glanzstreifen und als Adhäsionsprotein für die Verankerung des Zytoskeletts in die Plasmamembran verantwortlich. Neben dem Zusammenhalt von Zellen ist  $\beta$ -Catenin für die Aufrechterhaltung der Zell- und Gewebspolarität zuständig. Auch ist bekannt, dass  $\beta$ -Catenin in Kardiomyozyten nach Wnt-Expression gemeinsam mit Connexin-43 in der Zellmembran lokalisiert ist.

Die Wnt-Gene verschlüsseln eine große Gruppe von sezernierten Polypeptiden, die die Zell-Zell-Kommunikation sowohl im Erwachsenenalter als auch während der embryonalen Phase beeinflussen [121].

Neben seiner Funktion als Strukturprotein in den Adhering Junctions ist  $\beta$ -Catenin ein Transkriptionsfaktor, der durch Aktivierung über die Wnt-Signalkaskade in den Zellkern eintreten kann, um dort mit den Transkriptionsfaktoren TCF/LEF einen Komplex zu bilden und somit die Expression spezifischer Zielgene zu steuern. So kann  $\beta$ -Catenin in

Kardiomyozyten im Rahmen eines Adaptationsprozesses bei chronischem Stress hypertrophes Wachstum induzieren. Im Zuge von kardialem Remodeling, ausgelöst durch Stress oder Verletzung, weist die Wnt-Signalkaskade sowohl positive als auch negative Effekten auf das Myokard auf [63]. Die Herabregulierung von  $\beta$ -Catenin in Kardiomyozyten leitet die adaptive Hypertrophie ein, die für die Erhaltung kardialer Funktionen während chronischem Stress unerlässlich ist [29]. Bei Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie akkumuliert  $\beta$ -Catenin in den ICDs [66], und weist eine vermindert Expression im Endstadium der Herzinsuffizienz auf [62]. Zudem ist  $\beta$ -Catenin von immenser Wichtigkeit für die elektromechanische Kopplung im Herzen. Der Verlust von  $\beta$ -Catenin führt zu Gap Junction Remodeling und der Entstehung von Arrhythmien bis hin zum plötzlichen Herztod [99].

β-Catenin zeigte sich in unserem Western Blot in der mit G-CSF behandelten Gruppe signifikant erhöht (vgl. Abbildung 3.15). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die zeigen konnten, dass G-CSF in Kardiomyozyten zur Aktivierung der Wnt-Jak2-Signalkaskade und der daraus folgenden Hochregulierung des Connexin-43-Proteingehalts und Phosphorylierungsgrads führt [56]. Zudem konnte gezeigt werden, dass Wnt-1 über die β-Catenin vermittelte transkriptionale Aktivierung spezifisch auf die Connexin-43-Expression einwirkt und so zur verstärkten Protein-Akkumulation und konsekutiver Formierung eines Gap Junction-Kanals führt [121]. Die Ergebnisse bestätigen somit unsere Hypothese, dass G-CSF über Augmentation des β-Catenin-Proteingehalts den Connexin-43-Proteingehalt erhöht, und somit zur Verbesserung der Zell-Zell-Kommunikation beizutragen scheint. Um ein umfassenderes Verständnis der beteiligten Akteure und Prozesse im Rahmen der elektromechanischen Kopplung zu erlangen, könnte untersucht werden, ob sich der Einsatz von G-CSF immunhistochemisch positiv auf die Dichte und Ko-Lokalisation beider Proteine auswirkt. In diesem Kontext könnten weitere Bestandteile der Adhering Junction wie Cadherin, y-Catenin (Plakoglobin) und p120ctn untersucht werden, sowie der direkte Bindungspartner von β-Catenin, α-Catenin, der an Zona occludens-1-Protein (ZO-1), Vinculin und a-Actinin bindet [29]. ZO-1 ist sowohl Bestandteil der Tight Junctions als auch der Adhering Junctions, und als Interaktionspartner von Connexin-43 auch an der Signalkaskade im Bereich der Gap Junctions beteiligt.

Weitere Untersuchungen der an der elektromechanischen Kopplung im Myokard beteiligten Akteure erscheinen für ein besseres Verständnis des elektromechanischen Remodeling im Rahmen der diastolischen Herzinsuffizienz sinnvoll.

#### 4.7 Klinische Bedeutung

Eine diastolische Herzinsuffizienz liegt bei der Hälfte der Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz vor und weist eine steigende Prävalenz, Morbidität und Mortalität auf. Bis jetzt existieren nur wenig kurative Therapieansätze [68]. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass sich die Applikation von G-CSF nach Myokardinfarkt positiv auf das linksventrikuläre Remodeling, die kardiale Pumpfunktion und die beschleunigte Heilung auswirkt [35,70]. Dies wurde auf die Effekte von G-CSF auf die Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark und darauffolgende Transdifferenzierung, auf die Verminderung der Apoptose-Rate, und auf die geometrischen Veränderungen des Infarktgewebes durch Verminderung der Fibrose zurückgeführt [76,117].

Angesichts der fehlenden kurativen Therapieansätze und des komplexen Krankheitsbildes der HFpEF sind neue Tiermodelle, die nicht-ischämisches kardiales Remodeling untersuchen, von Interesse. Dies wiegt besonders vor dem Hintergrund schwer, dass im Gegensatz zur Behandlung von Patienten mit reduzierter EF Studien zeigen konnten, dass die neurohumerale Blockade als Therapieoption bei HFpEF-Patienten nicht zu einer Verbesserung der Mortalität oder Lebensqualität führt [75]. Paulus et al. konnten demonstrieren, dass sich die Prognose der HFpEF trotz eines vergleichbaren therapeutischen Einsatzes von ACE-Hemmern, Angiotensin-II-Rezeptor-Blockern und β-Blockern nicht verbessert hat [80].

Mit dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich die Behandlung mit G-CSF positiv auf funktionelle und morphologische Parameter bei diastolischer Funktionsstörung im Mausmodell auswirkt.

Die Haupterkenntnis dieser Arbeit ist der Nachweis, dass sich G-CSF zur Behandlung einer diastolischen Funktionsstörung im Mausmodell positiv auf das kardiale Remodeling auswirkt und somit zu einer Funktionsverbesserung kardiale Parameter führt. Dieser protektiven Wirkung liegt eine Verminderung des myokardialen Fibrosegehalts zu Grunde. Die Ergebnisse stehen in Einklang mit den Untersuchungen von Jia, die zeigen konnte, dass G-CSF präventiv auf die Entstehung AngiotensinII-induzierter kardialer Fibrose und Hypertrophie einwirkt [42]. Angesichts der herausragenden Rolle von Angiotensin-II in der Pathogenese der HFpEF und seiner Wirkung auf kardiale Fibroblasten und die Kollagensynthese ist ein Tiermodell, das die Wirkung von niedrig dosiertem ATII über einen längeren Zeitraum beobachten, besonders interessant (vgl. [101,103]). Daraus könnten sich neue Therapieoptionen ergeben, die auf die Verhinderung der Fibroseentstehung im Rahmen des Remodelingprozesses abzielen.

Da die systemische Inflammation im Kontext vieler Komorbiditäten auftritt, die mit HFpEF assoziiert sind, ist die Bedeutung des inflammatorischen Geschehens in der Pathogenese der HFpEF von besonderem Interesse. Im Zuge der Aktivierung inflammatorischer Prozesse kommt es zur Beeinträchtigung zahlreicher zellulären Signalkaskaden der Kardiomyozyten [81]. Nicht umsonst ist die inflammatorische Aktivierung prädiktiv für die Inzidenz der HFpEF, aber nicht für die der HFrEF [44]. Vor diesem Hintergrund ist es daher erwähnenswert, dass es in dem low-dose ATII-Tiermodell nicht zur Aktivierung der klassischen akuten Entzündungskaskade kommt. Die Verbesserung kardialer Funktionsparameter ist wahrscheinlich nicht durch die Regulation klassischer Inflammationsparameter zu erklären, sondern durch eine Hochregulation der ebenfalls immunmodulatorischen Zytokine Cathelicidin und Lactoferrin. Dies weist auf einen bis her noch wenig erforschten Mechanismus des inflammatorischen Geschehens im Rahmen der diastolischen Funktionsstörung hin. In diesem Zusammenhang könnten weitere Studien den Einfluss von G-CSF auf maßgeblich an der inflammatorischen Geschehen beteiligten Akteure wie Stickstoffmonoxid (NO) und cGMP/PK-G untersuchen, die ihrerseits eng mit der Kollagen-Homöostase in Beziehung stehen [127].

Darüber hinaus lässt sich aus unserer Arbeit ableiten, dass G-CSF über eine Erhöhung der Gap Junction Proteine  $\beta$ -Catenin und Connexin-43 nicht nur präventiv auf die Entstehung des elektromechanischen Remodeling einwirkt, sondern im längeren Verlauf das nachfolgende Auftreten von Fibrose abschwächt. Dies ist angesichts der beiden Tatsachen, dass erstens 60% der Todesfälle bei HFpEF-Patienten kardiovaskulär bedingt sind und der plötzliche Herztod und die Herzinsuffizienz die häufigsten Gründe sind, und zweitens die Ventrikulären Tachyarrhythmien der Hauptgrund für den Plötzlichen Herztod bei Herzinsuffizienz-Patienten ist, bemerkenswert [69,125].

Fraglich ist, ob der Einsatz von G-CSF angesichts der klinisch meist sehr heterogenen Patientenpopulation mit HFpEF, die meistens nicht nur eine isolierte diastolische Funktionsstörung aufweist, wirkungsvoll wäre. Zudem stellt sich die grundlegende Frage, inwieweit sich die Ergebnisse aus dem Mausgewebe auf den humanen Bereich übertragen lassen. Dabei ist zu beachten, dass in dieser Studie junge weibliche Versuchstiere verwendet wurden, während die meisten kardiovaskulär erkrankten Patienten ein höheres Lebensalter aufweisen. Im Rahmen der Bedeutung des Gender-Aspekts in der Pathogenese der HFpEF ließen sich bei ca. 90% der Herzinsuffizienz-Fälle bei älteren Frauen eine HFpEF beobachten, was veranschaulicht, dass der HFpEF-Patient sehr viel häufiger weiblich ist [33]. In Hinblick auf die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf ältere Patienten sind nicht nur weitere Studien an alternden Mäusen, sondern auch an Tiermodellen notwendig, die die komplexe Pathophysiologie und das Zusammenspiel der Komorbiditäten wie Adipositas, Diabetes, chronische Nierenerkrankung und Vorhofflimmern im Rahmen der HFpEF simulieren [93].

Nur durch einen optimierten multimodalen Therapieansatz der HFpEF scheint ein kurativer Behandlungserfolg möglich. Ausgehend von den hier vorliegenden Daten könnte der Einsatz von G-CSF zur Behandlung der diastolischen Funktionsstörung daher ein Bestandteil dieses Therapieansatzes werden. Diese Ergebnisse tragen zu einem besseren Verständnis der Mechanismen auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene bei, was die Voraussetzung für die Verwendung in weiteren klinischen Studien und später in der Klinik ist.

# 5. Zusammenfassung/ Summary

Trotz aller Bemühungen ist bis heute keine kurative Therapie der diastolischen Herzinsuffizienz verfügbar. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Applikation von G-CSF das klinische Outcome nach Myokardinfarkt verbessern kann. Da das Wirkungsspektrum von G-CSF auf das Myokard sehr breit ist, besteht aktuell ein großes Forschungsinteresse an der Verwendung von G-CSF im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen. Manche Studien berichten Erfolge, andere Studien keine Effekte bei der Verwendung von G-CSF. Hierzu steht im Widerspruch, dass Vorarbeiten von Szardien et al. gezeigt hatten, dass G-CSF in einem linksventrikulären Hypertrophie-Modell an der Maus zu einer Regression der Hypertrophie und Fibrose führt.

Mit dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die Behandlung mit G-CSF positiv auf das myokardiale Remodeling bei isolierter diastolischer Funktionsstörung im Mausmodell auswirkt. Zur Untersuchung des Einflusses von G-CSF auf Veränderungen der extrazellulären Matrix und auf Entzündungsprozesse wurde in einem Tiermodell an der Maus eine osmotische Mikropumpe implantiert, die durch kontinuierliche Applikation von niedrig dosiertem AngiotensinII zu einer diastolischen Funktionsstörung führt. Darüber hinaus erfolgte die Untersuchung eines möglichen Einflusses von G-CSF auf Gap Junctions im Rahmen der intraventrikulären elektromechanischen Kopplung. Der G-CSF- Gruppe wurde nach zwei beziehungsweise nach vier Wochen für sieben Tage G-CSF (300 µg/kg/KG) subkutan verabreicht, die Kontrollgruppe erhielt NaCl in selber Dosierung. Die Nach Ablauf der beiden Versuchszeiträume wurden die diastolischen Funktionsparameter (E'/A', E/E') mithilfe der hochauflösenden Echokardiographie Euthanasierung der validiert. und nach Tiere die Myokardproben mit immunhistologischen und molekularbiologischen (Western Blot, qRT-PCR) Verfahren untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass G-CSF über die Verminderung des Kollagengehalts zu einer Reduktion der myokardialen Fibrose führt. Die Regression der Fibrose ist in diesem Modell nicht durch eine G-CSF-bedingte Verminderung der inflammatorischen Aktivität bedingt, da sich G-CSF in beiden Versuchszeiträumen nicht

auf die klassischen Inflammationsparameter oder auf die Einwanderung inflammatorischer Zellen (Makrophagen und Neutrophile Granulozyten) auszuwirken scheint. Das signifikant erhöhte Expressionsprofil der Proteine CAMP und Lactoferrin jedoch durch eine konsekutiv verminderte Einwanderung kardialer Fibroblasten zur Reduktion der kardialen Fibrose beitragen. Der Nachweis eines signifikant erhöhten Connexin-43- Proteingehalts in der mit G-CSF behandelten Gruppe im Western Blot legt die Vermutung nahe, dass G-CSF im Rahmen der diastolischen Funktionsstörung über eine Erhöhung des Gap Junction Proteins Connexin-43 nicht nur präventiv auf die Entstehung des elektromechanischen Remodeling einwirkt, sondern im längeren Verlauf das nachfolgende Auftreten von Fibrose abschwächt. Ursächlich für die Erhöhung von Connexin-43 könnte die Erhöhung des Strukturproteins ß-Catenin sein, welches im Western Blot in der mit G-CSF behandelten Gruppe ebenfalls signifikant erhöht war. Die Ergebnisse bestätigten somit die Hypothese, dass G-CSF über Augmentation des β-Catenin-Proteingehalts den Connexin-43-Proteingehalt erhöht, und somit wahrscheinlich zur Verbesserung der elektromechanischen Kopplung beiträgt.

Die hier dargestellten Ergebnisse geben einen wichtigen Einblick in die längerfristigen adaptiven Mechanismen im Rahmen der diastolischen Funktionsstörung und bieten die Möglichkeit, den therapeutischen Einsatz von G-CSF im Rahmen der diastolischen Herzinsuffizienz zu verbessern, und so den Verlauf der Erkrankung positiv zu beeinflussen.

## 6. Summary

Although HFpEF represents approximately 50% of all patients with heart failure, the mechanisms involved in the pathophysiology are still poorly understood. Furthermore, the clinical syndrome comprising heart failure symptoms is increasing in prevalence, morbidity and mortality and will reach soon epidemic proportions due to demographic change and rising comorbidities. For the clinician, it remains among the most challenging of clinical syndromes as a variety of myocardial mechanisms and the presence of common comorbidities are involved. Until now there is no effective treatment nor animal models that are not based on pressure overload.

As recently demonstrated, granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) has beneficial effects on the healing process and myocardial regeneration after myocardial infarction. Furthermore, G-CSF modulates the inflammatory reaction in a mouse-model of pressure overload and subsequent unloading, leading to a regression of cardiac fibrosis and a significant improvement of functional parameters.

As fibrosis plays a pivotal role in the pathogenesis of HFpEF we developed an animal model for HFpEF using mice and treated these mice with G-CSF. The mouse model reflects the pathological effects of chronic infusion of low dose Angiotensin-II leading to the HFpEF phenotype and grants better insights into the pathophysiology of diastolic heart failure.

We hypothesized that G-CSF prevents cardiac remodeling by decreasing myocardial collagen content and thereby leading to a regression of fibrosis. In addition, the effects of G-CSF on inflammatory processes and the electromechanical remodeling were investigated.

Healthy C57BL6/J-mice received a continuous infusion of low dose Angiotensin II (AngII,  $0.5 \mu g/kg/min$ ) via an osmotic pump. After one or four weeks, diastolic functional parameters (E'/A', E/E') were measured by high-resolution echocardiography. The mice were randomized in an experimental group (G-CSF 300  $\mu g/kg$  BW/d) and a control group (saline). Two-time responses were examined (7d vs. 28d). Immunohistochemistry revealed increased fibrosis in the saline-treated mice whereas treatment with G-CSF led to a regression of fibrosis and decreased myocardial collagen content. Fibrosis was measured using Picrosirius Red stain.

Analysis of inflammatory mediators such as neutrophils and monocytes showed no difference in cell-amount nor expression of classical cytokines. Interestingly, the expression of immunomodulatory cytokines Lactoferrin and Cathelicidin were significantly increased in G-CSF treated mice suggesting a so far unknown mechanism of G-CSF induced immunomodulation. Beyond that G-CSF led to an increased Connexin-43-protein content subsequent to an increased amount of the signal protein  $\beta$ -Catenin in Western Blotting.

These findings suggest that G-CSF diminishes myocardial fibrosis by regulating inflammatory mechanisms apart from the established pathways. The regression of cardiac fibrosis leads to a prevention of gap junction remodeling that often precedes cardiac remodeling. With a better understanding about the impact of G-CSF on cardiac function one might be able to optimize the administration of G-CSF in patients with HFpEF and thus improve clinical outcome.

# 7. Publikationen

#### Abstract:

Sebastian Szardien, Holger M Nef, Sandra Voβ, Christian Troidl, Matthias Willmer, Chistoph Liebetrau, Jedrzej Hoffmann, <u>Stella Jacobi</u>, Johannes Rixe, Andreas Rolf, Christian W Hamm and Helge Möllmann: G-CSF Leads to a Normalization of Diastolic Function in a Mouse Model of Diastolic Heart Failure, Circulation, 20 November 2012, Volume 126, Issue Suppl 21, Abstract 14075

#### **Poster:**

S. Szardien, H. M. Nef, S. Voss, C. Troidl, C. Liebetrau, M. Willmer, J. Hoffmann, J. Rixe, <u>S. Jacobi</u>, B. Kojonazarov, C. W. Hamm, H. Möllmann (Bad Nauheim, Giessen): G-CSF führt zur Normalisierung der diastolischen Funktion im murinen Modell der diastolischen Herzinsuffizienz, 78. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Freitag, 13. April 2012, Mannheim

S.Szardien, H.M. Nef, C Liebetrau, M Willmer, C Troidl, S Voss, J Hoffmann, <u>S Jacobi</u>, C Hamm, H Moellmann; G-CSF leads to a normalization of diastolic function in a mouse model of diastolic heart failure, P386, European Heart Journal (2012) 33 (Abstract Supplement), 35

# 8. Abkürzungsverzeichnis

| A         | Late Mitral valve flow velocity                           |
|-----------|---|
| ATII      | Angiotensin II  |
| ACE       | Angiotensin-converting-enzyme                             |
| BNP       | Brain natriuretic peptide                                 |
| CITP      | Carboxy-terminal telopeptide of collagen type I           |
| DAMPs     | Damage associated molekular patters                       |
| DD        | Diastolische Dysfunktion                                  |
| DHF       | Diastolische Herzinsuffizienz                             |
| Е         | Early mitral valve flow velocity                          |
| E/A       | Ratio of early (E) to late (A) mitral valve flow velocity |
| EF        | Ejektionsfraktion   |
| EZM       | Extrazelluläre Matrix                                     |
| GADPH     | Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase                  |
| sGC       | soluble Guanylatcyclase                                   |
| cGMP      | cyclic Guanosinmonophosphate                              |
| G-CSF     | Granulocyte colony stimulating factor                     |
| HFnEF     | Heart failure with normal ejection fraction               |
| HFpEF     | Heart failure with preserved ejection fraction            |
| HFrEF     | Heart failure with reduced ejection fraction              |
| LVEDP     | Left ventricular end-diastolic pressure                   |
| LVEF      | Left ventricular ejection fraction                        |
| LVEDVI    | Left ventricular end-diastolic volume index               |
| MCP-1     | Chemotaktische Monozyten Protein-1 (MCP-1)                |
| MMP       | Matrix metalloproteinases                                 |
| NO        | Stickstoffmonoxid   |
| NT-proBNP | N-terminal pro brain natriuretic peptide                  |
| NYHA      | New York Heart Association                                |
| mPCWP     | Mean pulmonary capillary wedge pressure;                  |
| PINP      | Amino-terminal propeptide of procollagen type I           |
| PIIINP    | Amino-terminal propeptide of procollagen type III         |
| PCWP      | Pulmonary Capillary Wedge Pressure                        |
| cPO       | chronic pressure overload                                 |
| PKG       | Protein kinase G/ cGMP-dependent protein kinase           |
| qRT-PCR   | Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction          |
| RAAS      | Renin-Angiotensin-Aldosteron-System                       |
| ROS       | Reactive oxygene species                                  |
| SCD       | Sudden Cardiac Death                                      |
| SERCA2a   | SR-Ca2+-ATPase  |
| TAC       | Transverse Aortic constriktion                            |
| TCF/LEF   | T-cell factor/ Lymphoid enhancer factor                   |
| TGF-β     | Transforming growth factor β                              |
| TIMP      | Tissue inhibitors of metalloproteinases                   |
| VCAM      | Vascular cell adhesion protein                            |

# 9. Abbildungsverzeichnis

| Abbildung 1.1: Schaubild der an der Pathogenese der diastolischen Funktionsstörung beteiligten Akteure.     |
|---|
| Komorbiditäten wie Hypertonie, Adipositas und Diabetes mellitus induzieren einen systemischen               |
| INFLAMMATORISCHEN ZUSTAND, DER ÜBER EINWANDERUNG UND ADHÄSION VON INFLAMMATORISCHEN ZELLEN                  |
| (Monozyten/ Makrophagen, neutrophile Granulozyten) zur verstärkten Sekretion                                |
| PROINFLAMMATORISCHER ZYTOKINE FÜHRT. DIE RESULTIERENDE ENDOTHELIALE DYSFUNKTION GEHT IM WEITEREN            |
| Verlauf mit einer erhöhten Rückstellkraft und Steifheit der Kardiomyozyten einher                           |
| Abbildung 1.2: Abbildung der verwendeten osmotischen Pumpe der Firma SIGMA (Modell ALZET), die mit          |
| ANGIOTENSIN II (LOW-DOSE, 500NG/KG KG/MIN) BEFÜLLT WURDE  |
| Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der echokardiographischen Validierung des Mausmodells mit           |
| ISOLIERTER DIASTOLISCHER DYSFUNKTION. DIE EJEKTIONSFRAKTION BLEIBT DURCH DIE APPLIKATION VON ANGIOTENSIN    |
| II UNVERÄNDERT, ES ENTSTEHT EINE ISOLIERTE DIASTOLISCHE FUNKTIONSSTÖRUNG                                    |
| ABBILDUNG 1.4 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES VERSUCHSAUFBAUS MIT ZEITPLÄNEN                                   |
| ABBILDUNG 3.1: DARSTELLUNG DER LINKSVENTRIKULÄREN EJEKTIONSFRAKTION (LVEF)                                  |
| Abbildung 3.2: Gewebsdoppler: Nach 28 Tagen Angiotensin II Infusion zeigte sich die diastolische Funktion   |
| SIGNIFIKANT BEEINTRÄCHTIGT, DARGESTELLT DURCH EINE VERMINDERTES E'/A' SOWIE EIN ERHÖHTES E/E'               |
| ABBILDUNG 3.3: QRT-PCR VON BNP: DIE ABBILDUNG ZEIGT EINE REPRÄSENTATIVE DOKUMENTATION DER QRT-PCR-          |
| ERGEBNISSE. DIE BNP-EXPRESSION IN DER MIT G-CSF BEHANDELTEN GRUPPE WAR IM VERGLEICH ZU DEN MIT NACL         |
| BEHANDELTEN MÄUSEN SOWIE ZUR HFPEF-GRUPPE SIGNIFIKANT VERMINDERT. DARGESTELLT SIND DIE MITTELWERTE          |
| +/-SD, N(GESAMT)=18; SHAM=2, G-CSF-28D=8, HFPEF-28D =4, NACL-28D =4   |
| Abbildung 3.4: Darstellung des Kollagengehalts in der Picro Sirius Red-Färbung: Myokard (gelb),             |
| kollagenreiches Bindegewebe (rot), (obere Abbildung) und Auswertung des immunhistochemischen                |
| NACHWEISES DES GESAMTKOLLAGENGEHALTS IN DER PICROSIRIUS RED FÄRBUNG (UNTERE ABBILDUNG)                      |
| Abbildung 3.5: Zeitverlauf des Kollagengehalts in der Picro Sirius Red-Färbung (obere Abbildung): Myokard   |
| (gelb), kollagenreiches Bindegewebe (rot), und die Auswertung (untere Abbildung)                            |
| ABBILDUNG 3.6: AUSWERTUNG DES KOLLAGEN-I-GEHALTS NACH IMMUNHISTOCHEMISCHER FÄRBUNG                          |
| Abbildung 3.7: Western Blot Kollagen-I  |
| ABBILDUNG 3.8: IMMUNFÄRBUNG VON CD68 UND NIMP-R14 UND AUSWERTUNG  |
| Abbildung 3.9: Im Vergleich der Zeiträume 7-Tage vs. 28-Tage zeigen sich weder in den mit G-CSF behandelten |
| GRUPPEN NOCH IN DEN NACL-KONTROLLGRUPPEN SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE HINSICHTLICH DER ANZAHL                  |
| MARKIERTER ZELLEN; KERNFÄRBUNG MIT DAPI (BLAU), DARGESTELLT SIND DIE MITTELWERTE +/-SEM                     |
| ABBILDUNG 3.10:QRT-PCR DER KLASSISCHEN INFLAMMATIONSTARGETS IL-1B, IL-6, IL-10, IL-18, CCL-2 (MPC-1), TNF-A |
| AUS DEN ZWEI VERSUCHSZEITRÄUMEN 7-TAGE VS. 28-TAGE  |
| Abbildung 3.11: QRT-PCR von Cathelicidin und Lactoferrin im 28-Tage-Versuchszeitraum; die Menge der         |
| MRNA-TRANSKRIPTE WURDE MITTELS QRT-PCR BESTIMMT. ES ZEIGT SICH EINE SIGNIFIKANT ERHÖHTE EXPRESSION          |
| der beiden Inflammationstargets im Vergleich zur Sham- und NaCl-Kontrollgruppe. Dargestellt sind            |
| DIE MITTELWERTE +/-SD   |
| Abbildung 3.12: QRT-PCR von Cathelicidin (CAMP) links, und Lactoferrin (LTF) rechts im Zeitverlauf. Die     |
| MENGE DER MRNA-TRANSKRIPTE WURDE MITTELS QRT-PCR BESTIMMT. ES ZEIGT SICH EINE DEUTLICH ERHÖHTE              |
| CATHELICIDIN-EXPRESSION INNERHALB DER MIT G-CSF BEHANDELTEN GRUPPEN, SOWOHL IM KÜRZEREN 7-TAGE- ALS         |
| AUCH IM LANGEN 28-TAGE-VERSUCHSZEITRAUM   |
| Abbildung 3.13: Western Blot Connexin-43  |
| Abbildung 3.14: Western Blot Connexin-43 im Zeitverlauf   |
| Abbildung 3.15: Western Blot B-Catenin  |
| ABBILDUNG 3.16: WESTERN BLOT B-CATENIN IM ZEITVERGLEICH   |

# 10. Tabellenverzeichnis

| TABELLE 2.1: EINTEILUNG UND ANZAHL DER VERSUCHSTIERE, INSG. 60 C57BL6- WILDTYP- MÄUSE                   | 28   |
|---|------|
| Tabelle 2.2: Berechnung der für die Behandlung zu spritzenden G-CSF-Menge, (Granocyte® 300 $\mu$ g/kg K | G*D- |
| 1)  | 30   |
| TABELLE 2.3: AUFFÜHRUNG DER FÜR DIE REVERSE TRANSKRIPTION DURCHGEFÜHRTEN INKUBATIONSSCHRITTE            | 33   |
| TABELLE 2.4: BESTANDTEILE DER POLYMERASE-KETTEN-REAKTION. ABKÜRZUNGEN: PCR, POLYMERASE CHAIN REACTION   | N;   |
| DNA, DEOXYRIBOSE NUCLEIC ACID   | 34   |
| TABELLE 2.5: STANDARD-PROGRAMM FÜR DIE ZYKLEN IN DER QUANTITATIVE REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CH   | IAIN |
| REACTION  | 35   |
| TABELLE 2.6: BESTANDTEILE DER QRT-PCR   | 36   |
| TABELLE 2.7: DARSTELLUNG DER FÜR DAS IMMUNOBLOTTING VERWENDETEN INKUBATIONS- UND WASCHSCHRITTE          | 40   |
| TABELLE 2.8: DARSTELLUNG DER FÜR DIE IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG DURCHGEFÜHRTEN INKUBATIONS- UND        |      |
| WASCHSCHRITTE, RT= RAUMTEMPERATUR, PBS= PHOSPHATE BUFFERED SALINE, PFA= PARAFORMALDEHYDE                | 42   |
| TABELLE 12.1: LABORGERÄTE   | 94   |
| TABELLE 12.2: PUFFER UND LÖSUNGEN   | 95   |
| TABELLE 12.3: VERBRAUCHSMATERIALIEN   | 95   |
| TABELLE 12.4: EDV-PROGRAMME   | 96   |
| TABELLE 12.5: VERZEICHNIS DER IMMUNHISTOLOGISCH UND MOLEKULARBIOLOGISCH VERWENDETEN ANTIKÖRPER          | 97   |
| TABELLE 12.6: ENZYME, CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN  | 97   |
| TABELLE 12.7: MOLEKULARBIOLOGISCHE KITS   | 98   |
| TABELLE 12.8: VERZEICHNIS DER VERWENDETEN OLIGONUKLEOTIDE/PRIMER-APPENDIX                               | 98   |

#### 11. Literatur

- 1. Abdel-Latif A, Bolli R, Zuba-Surma E K et al (2008) Granulocyte colonystimulating factor therapy for cardiac repair after acute myocardial infarction: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. American Heart Journal 156(2): 216-226.e9
- 2. Achilli F, Malafronte C, Maggiolini S et al (2014) G-CSF treatment for STEMI: final 3-year follow-up of the randomised placebo-controlled STEM-AMI trial. Heart
- Ahmed S H (2006) Matrix Metalloproteinases/Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Relationship Between Changes in Proteolytic Determinants of Matrix Composition and Structural, Functional, and Clinical Manifestations of Hypertensive Heart Disease. Circulation 113(17): 2089–2096
- 4. Aiba T, Tomaselli G F (2010) Electrical remodeling in the failing heart. Current Opinion in Cardiology 25(1): 29–36
- Akar F G (2004) Mechanisms Underlying Conduction Slowing and Arrhythmogenesis in Nonischemic Dilated Cardiomyopathy. Circulation Research 95(7): 717–725
- 6. Angeja B G (2003) Evaluation and Management of Diastolic Heart Failure. Circulation 107(5): 659–663
- 7. Bauersachs J, Widder J D (2008) Endothelial dysfunction in heart failure. Pharmacol Rep 60(1): 119–126
- 8. Bensley J G, Matteo R D, Harding R et al Three-dimensional direct measurement of cardiomyocyte volume, nuclearity, and ploidy in thick histological sections. Scientific Reports 6: 23756
- 9. Bhatia R S (2006) Outcome of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction in a Population-Based Study. N Engl J Med 2006;355:260-9.: 260–269
- Boneberg E-M (2000) Human monocytes express functional receptors for granulocyte colony– stimulating factor that mediate suppression of monokines and interferon- Human monocytes express functional receptors for granulocyte colony– stimulating factor that mediate suppression of monokines and interferon- • .
  BLOOD, 1 JANUARY 2000 • VOLUME 95, NUMBER 1: 270–276
- 11. Borlaug B A, Jaber W A, Ommen S R et al (2011) Diastolic relaxation and compliance reserve during dynamic exercise in heart failure with preserved ejection fraction. Heart 97(12): 964–969
- 12. Borlaug B A, Paulus W J (2011) Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment. European Heart Journal 32(6): 670–679
- Borlaug B A, Kass D A (2011) Ventricular-vascular interaction in heart failure. Cardiology Clinics 29(3): 447–459
- 14. Bournazou I, Pound J D, Duffin R et al (2009) Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin. J Clin Invest 119(1): 20–32
- Chaturvedi R R, Herron T, Simmons R et al (2010) Passive stiffness of myocardium from congenital heart disease and implications for diastole. Circulation 121(8): 979–988

- Chung C S, Granzier H L (2011) Contribution of titin and extracellular matrix to passive pressure and measurement of sarcomere length in the mouse left ventricle☆. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 50(4): 731–739
- 17. Council N R Guide for the Care and Use of Laboratory Animals
- 18. Cutler M J, Jeyaraj D, Rosenbaum D S (2011) Cardiac electrical remodeling in health and disease. Trends in Pharmacological Sciences 32(3): 174–180
- 19. Dupont E (2001) Altered Connexin Expression in Human Congestive Heart Failure. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 33(2): 359–371
- 20. Eapen Z, Rogers J G (2009) Strategies to attenuate pathological remodeling in heart failure. Current Opinion in Cardiology 24(3): 223–229
- 21. Fontes M S C (2014) Changes in Cx43 and NaV1.5 Expression Precede the Occurrence of Substantial Fibrosis in Calcineurin-Induced Murine Cardiac Hypertrophy. PLoS ONE 9(1): e87226
- 22. Franssen C, Chen S, Unger A et al (2015) Myocardial Microvascular Inflammatory Endothelial Activation in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. JACC: Heart Failure
- Franssen C, González Miqueo A (2016) The role of titin and extracellular matrix remodelling in heart failure with preserved ejection fraction. Neth Heart J 24(4): 259–267
- 24. Frederick M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingst Current Protocols in Mol. Biol. ISBN: 047150338X
- 25. Fujiu K, Wang J, Nagai R (2014) Cardioprotective function of cardiac macrophages. Cardiovascular Research 102(2): 232–239
- 26. Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T et al (2004) G-CSF promotes bone marrow cells to migrate into infarcted mice heart, and differentiate into cardiomyocytes. Cell Transplant 13(7-8): 741–748
- 27. Gaasch W H, Zile M R (2004) Left Ventricular Diastolic Dysfunction and Diastolic Heart Failure. Annu. Rev. Med. 55(1): 373–394
- Gelzinis T A (2014) New Insights Into Diastolic Dysfunction and Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. Seminars in Cardiothoracic and Vascular Anesthesia 18(2): 208–217
- 29. Giepmans B (2004) Gap junctions and connexin-interacting proteins. Cardiovascular Research 62(2): 233–245
- 30. Gladden J D, Linke W A, Redfield M M (2014) Heart failure with preserved ejection fraction. Pflugers Arch 466(6): 1037–1053
- 31. Glezeva N Role of inflammation in the pathogenesis of heart failure with preserved ejection fraction and its potential as a therapeutic target. Heart Fail Rev: 1–14
- 32. Glezeva N, Voon V, Watson C et al (2015) Exaggerated inflammation and monocytosis associate with diastolic dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction: evidence of M2 macrophage activation in disease pathogenesis. J Card Fail 21(2): 167–177
- 33. Gottdiener J S, Am Arnold, Aurigemma G P et al (2000) Predictors of congestive heart failure in the elderly: the Cardiovascular Health Study. Journal of the American College of Cardiology 35(6): 1628–1637

- 34. Grewal J, McKelvie R, Lonn E et al (2008) BNP and NT-proBNP predict echocardiographic severity of diastolic dysfunction. European Journal of Heart Failure 10(3): 252–259
- 35. Harada M, Qin Y, Takano H et al (2005) G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. Nat Med 11(3): 305–311
- 36. Hasenfuss G (1994) Relation between myocardial function and expression of SR ca2+- ATPase in failing and non-failing myocardium. Circulation Research: 434–442
- 37. Hogg K, McMurray J (2005) Neurohumoral Pathways in Heart Failure With Preserved Systolic Function. Progress in Cardiovascular Diseases 47(6): 357–366
- Horgan S, Watson C, Glezeva N et al (2014) Murine models of diastolic dysfunction and heart failure with preserved ejection fraction. J Card Fail 20(12): 984–995
- Hudson B, Hidalgo C, Saripalli C et al (2011) Hyperphosphorylation of Mouse Cardiac Titin Contributes to Transverse Aortic Constriction-Induced Diastolic Dysfunction. Circulation Research 109(8): 858–866
- 40. Hüttmann A, Dührsen U, Stypmann J et al (2006) Granulocyte colony–stimulating factor–induced blood stem cell mobilisation in patients with chronic heart failure. Basic Res Cardiol 101(1): 78–86
- 41. Iwanaga Y, Nishi I, Furuichi S et al (2006) B-Type Natriuretic Peptide Strongly Reflects Diastolic Wall Stress in Patients With Chronic Heart Failure. Journal of the American College of Cardiology 47(4): 742–748
- 42. Jia N, Dong P, Huang Q et al (2009) Cardioprotective effects of granulocyte colony-stimulating factor in angiotensin II-induced cardiac remodelling. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 36(3): 262–266
- 43. Kai H, Kuwahara F, Tokuda K et al (2005) Diastolic dysfunction in hypertensive hearts: roles of perivascular inflammation and reactive myocardial fibrosis. Hypertens. Res. 28(6): 483–490
- 44. Kalogeropoulos A, Georgiopoulou V, Psaty B M et al (2010) Inflammatory markers and incident heart failure risk in older adults: the Health ABC (Health, Aging, and Body Composition) study. Journal of the American College of Cardiology 55(19): 2129–2137
- 45. Kanlop N, Thommasorn S, Palee S et al (2011) Granulocyte colony-stimulating factor stabilizes cardiac electrophysiology and decreases infarct size during cardiac ischaemic/reperfusion in swine. Acta Physiologica 202(1): 11–20
- 46. Karen E. Porter, Neil A. Turner (2009) Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. Pharmacology and Therapeutics
- 47. Kastrup J, Ripa R S, Wang Y et al (2006) Myocardial regeneration induced by granulocyte-colony-stimulating factor mobilization of stem cells in patients with acute or chronic ischaemic heart disease: a non-invasive alternative for clinical stem cell therapy? European Heart Journal 27(23): 2748–2754
- Katholi R E, Couri D M (2011) Left Ventricular Hypertrophy: Major Risk Factor in Patients with Hypertension: Update and Practical Clinical Applications. International Journal of Hypertension 2011(1): 1–10
- 49. Katz A M (2006) New Molecular Mechanism in Diastolic Heart Failure. Circulation 113(16): 1922–1925

- Kavitha M. Chinnaiyan M D, Daniel Alexander D O, Peter A. McCullough M M (2005) Role of Angiotensin II in the Evolution of Diastolic Heart Failure. J Clin Hypertens (Greenwich) (7): 740–747
- 51. Komajda M, Lam C S P (2014) Heart failure with preserved ejection fraction: a clinical dilemma. European Heart Journal 35(16): 1022–1032
- 52. Kovacic J C, Muller D WM, Graham R M (2007) Actions and therapeutic potential of G-CSF and GM-CSF in cardiovascular disease. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 42(1): 19–33
- 53. Krüger M, Kötter S, Grützner A et al (2009) Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. Circ. Res. 104(1): 87–94
- 54. Kuhlmann M T (2006) G-CSF/SCF reduces inducible arrhythmias in the infarcted heart potentially via increased connexin43 expression and arteriogenesis. Journal of Experimental Medicine 203(1): 87–97
- 55. Kumagai S, Matsui K, Kawaguchi H et al (2013) Cathelicidin antimicrobial peptide inhibits fibroblast migration via P2X7 receptor signaling. Biochemical and Biophysical Research Communications 437(4): 609–614
- 56. Kuwabara M, Kakinuma Y, Katare R G et al (2007) Granulocyte colonystimulating factor activates Wnt signal to sustain gap junction function through recruitment of β-catenin and cadherin. FEBS Letters 581(25): 4821–4830
- 57. LaFramboise W A, Scalise D, Stoodley P et al (2006) Cardiac fibroblasts influence cardiomyocyte phenotype in vitro. AJP: Cell Physiology 292(5): C1799-C1808
- 58. Lam C S P, Donal E, Kraigher-Krainer E et al (2010) Epidemiology and clinical course of heart failure with preserved ejection fraction. European Journal of Heart Failure 13(1): 18–28
- 59. Laurent GJ. Dynamic state of collagen pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of collagen mass Laurent
- Lekavich C L, Barksdale D J, Neelon V et al (2015) Heart failure preserved ejection fraction (HFpEF): an integrated and strategic review. Heart Fail Rev 20(6): 643–653
- 61. Lund L H, Benson L, Dahlström U et al (2012) Association Between Use of Renin-Angiotensin System Antagonists and Mortality in Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction. JAMA 308(20): 2108
- 62. Mahmoodzadeh S, Eder S, Nordmeyer J et al (2006) Estrogen receptor alpha upregulation and redistribution in human heart failure. FASEB J 20(7): 926–934
- Malekar P, Hagenmueller M, Anyanwu A et al (2010) Wnt signaling is critical for maladaptive cardiac hypertrophy and accelerates myocardial remodeling. Hypertension 55(4): 939–945
- 64. Martos R, Baugh J, Ledwidge M et al (2007) Diastolic Heart Failure: Evidence of Increased Myocardial Collagen Turnover Linked to Diastolic Dysfunction. Circulation 115(7): 888–895
- 65. Martos R, Baugh J, Ledwidge M et al (2009) Diagnosis of heart failure with preserved ejection fraction: improved accuracy with the use of markers of collagen turnover. European Journal of Heart Failure 11(2): 191–197
- Masuelli L, Bei R, Sacchetti P et al (2003) Beta-catenin accumulates in intercalated disks of hypertrophic cardiomyopathic hearts. Cardiovascular Research 60(2): 376–387

- 67. McMurray J J (2000) Epidemiology, aetiology and prognosis of heart failure. Heart (83): 596–602
- 68. McMurray J J V, Adamopoulos S, Anker S D et al (2012) ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. European Journal of Heart Failure 14(8): 803–869
- 69. Milberg P, Klocke R, Frommeyer G et al (2011) G-CSF therapy reduces myocardial repolarization reserve in the presence of increased arteriogenesis, angiogenesis and connexin 43 expression in an experimental model of pacinginduced heart failure. Basic Res Cardiol 106(6): 995–1008
- 70. Minatoguchi S (2004) Acceleration of the Healing Process and Myocardial Regeneration May Be Important as a Mechanism of Improvement of Cardiac Function and Remodeling by Postinfarction Granulocyte Colony-Stimulating Factor Treatment. Circulation 109(21): 2572–2580
- 71. Mladěnka P, Semecký V, Bobrovová Z et al (2009) The effects of lactoferrin in a rat model of catecholamine cardiotoxicity. Biometals 22(2): 353–361
- 72. Mueller E E, Momen A, Masse S et al (2011) Electrical remodelling precedes heart failure in an endothelin-1-induced model of cardiomyopathy. Cardiovascular Research 89(3): 623–633
- Müller-Brunottea R (2007) Myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in patients with hypertension: results from the wedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation versus Atenolol (SILVHIA). Journal of Hypertension 2007, 25:1958–1966 (25): 1958–1966
- 74. Nelson O L, Robbins C T, Wu Y et al (2008) Titin isoform switching is a major cardiac adaptive response in hibernating grizzly bears. AJP: Heart and Circulatory Physiology 295(1): H366-H371
- 75. Oghlakian G O, Sipahi I, Fang J C (2011) Treatment of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: Have We Been Pursuing the Wrong Paradigm? Mayo Clin Proc 86(6): 531–539
- 76. Orlic D (2001) Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. Proc Natl Acad Sci U S A. (98): 344–349
- Ozer H 2000 Update of Recommendations for the Use of Hematopoietic Colony-Stimulating Factors: Evidence- Based, Clinical Practice Guidelines. J Clin Oncol. 2000 Oct 15;18(20):3558-85. 2000(18): 3558–3585
- 78. Paulus WJ T C (2007) How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. European Heart Journal 28(20): 2539–2550
- 79. Paulus W J, Tschöpe C, Sanderson J E et al (2007) How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. European Heart Journal 28(20): 2539–2550
- 80. Paulus W J, van Ballegoij J J M (2010) Treatment of heart failure with normal ejection fraction: an inconvenient truth! Journal of the American College of Cardiology 55(6): 526–537

- 81. Paulus W J, Tschöpe C (2013) A Novel Paradigm for Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. Journal of the American College of Cardiology 62(4): 263–271
- 82. Peters N S, Green C R, Poole-Wilson P A et al (1993) Reduced content of connexin43 gap junctions in ventricular myocardium from hypertrophied and ischemic human hearts. Circulation 88(3): 864–875
- 83. Pfaffl M W (2001) A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. Nucleic Acids Res 29(9): e45
- 84. Piccini J P, Klein L, Gheorghiade M et al (2004) New insights into diastolic heart failure: role of diabetes mellitus. The American Journal of Medicine 116(5): 64–75
- 85. Rajapakse A G, Yepuri G, Carvas J M et al (2011) Hyperactive S6K1 mediates oxidative stress and endothelial dysfunction in aging: inhibition by resveratrol. PLoS ONE 6(4): e19237
- 86. Rangrez A Y, Eden M, Poyanmehr R et al (2015) Myozap Deficiency Promotes Adverse Cardiac Remodeling via Differential Regulation of MAPK/SRF- and β-Catenin/GSK-3β-Signaling. J. Biol. Chem.: jbc.M115.689620
- 87. Redfield M M Burden of Systolic and Diastolic Ventricular Dysfunction in the Community. The Journal of the American Medical Association 2089: 194–202
- 88. Regan J A, Mauro A G, Carbone S et al (2015) A mouse model of heart failure with preserved ejection fraction due to chronic infusion of a low subpressor dose of angiotensin II. Am J Physiol Heart Circ Physiol 309(5): H771-8
- 89. Remme W (2001) Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure. European Heart Journal 22(17): 1527–1560
- 90. Sadoshima jun Molecular Characterization of Angiotensin II- Induced Hypertrophy of Cardiac Myocytes and Hyperplasia of Cardiac Fibroblasts
- 91. Sanganalmath S K, Abdel-Latif A, Bolli R et al (2011) Hematopoietic cytokines for cardiac repair: mobilization of bone marrow cells and beyond. Basic Res Cardiol 106(5): 709–733
- 92. Santhanakrishnan R, Chong J P C, Ng T P et al (2012) Growth differentiation factor 15, ST2, high-sensitivity troponin T, and N-terminal pro brain natriuretic peptide in heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction. European Journal of Heart Failure 14(12): 1338–1347
- 93. Sharma K, Kass D A (2014) Heart failure with preserved ejection fraction: mechanisms, clinical features, and therapies. Circulation Research 115(1): 79–96
- 94. Smeets P J H, Teunissen B E J, Planavila A et al (2008) Inflammatory Pathways Are Activated during Cardiomyocyte Hypertrophy and Attenuated by Peroxisome Proliferator-activated Receptors PPAR and PPAR. Journal of Biological Chemistry 283(43): 29109–29118
- 95. Sovari A A, Iravanian S, Dolmatova E et al (2011) Inhibition of c-Src tyrosine kinase prevents angiotensin II-mediated connexin-43 remodeling and sudden cardiac death. Journal of the American College of Cardiology 58(22): 2332–2339
- 96. Steinberg B A, Zhao X, Heidenreich P A et al (2012) Trends in patients hospitalized with heart failure and preserved left ventricular ejection fraction: prevalence, therapies, and outcomes. Circulation 126(1): 65–75
- 97. Studeli R, Jung S, Mohacsi P et al (2006) Diastolic Dysfunction in Human Cardiac Allografts is Related with Reduced SERCA2a Gene Expression. Am J Transplant 6(4): 775–782

- 98. Swedberg K (2005) Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. European Heart Journal 26(11): 1115–1140
- 99. Swope D (2012) Loss of cadherin-binding proteins beta-catenin and plakoglobin in the heart leads to gap junction remodeling and arrhythmogenesis. Molecular and Cellular Biology 32(6): 1056–1067
- 100. Szardien S, Nef H M, Voss S et al (2012) Regression of cardiac hypertrophy by granulocyte colony-stimulating factor-stimulated interleukin-1 synthesis. European Heart Journal 33(5): 595–605
- 101. Takano H, Qin Y, Hasegawa H et al (2006) Effects of G-CSF on left ventricular remodeling and heart failure after acute myocardial infarction. J Mol Med 84(3): 185–193
- 102. Theophilus E. Owan (2006) Trends in Prevalence and Outcome of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. The new england journal of medicine: 355:251-25
- 103. Tokuda K, Kai H, Kuwahara F et al (2004) Pressure-independent effects of angiotensin II on hypertensive myocardial fibrosis. Hypertension 43(2): 499–503
- 104. Toldo S, Marchetti C, Husseini A A et al (2014) Abstract 13407: A Mouse Model of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction (HFpEF) due to Chronic Infusion of a Low Subpressor Dose of Angiotensin II. Circulation 130(Suppl 2): A13407-A13407
- 105. Tschöpe C, van Linthout S (2014) New insights in (inter)cellular mechanisms by heart failure with preserved ejection fraction. Curr Heart Fail Rep 11(4): 436–444
- 106. Valero-Muñoz M, Backman W, Sam F (2017) Murine Models of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: a "Fishing Expedition". JACC Basic Transl Sci 2(6): 770–789
- 107. van der Velden J, van der Wall E E, Paulus W J (2016) Heart failure with preserved ejection fraction: current status and challenges for the future. Neth Heart J
- 108. van Heerebeek L (2006) Myocardial Structure and Function Differ in Systolic and Diastolic Heart Failure. Circulation 113(16): 1966–1973
- 109. van Heerebeek L, Paulus W J (2016) Understanding heart failure with preserved ejection fraction: where are we today? Neth Heart J
- 110. Velden J (2011) Diastolic myofilament dysfunction in the failing human heart. Pflugers Arch - Eur J Physiol 462(1): 155–163
- 111. Vengen I T, Dale A C, Wiseth R et al (2010) Lactoferrin is a novel predictor of fatal ischemic heart disease in diabetes mellitus type 2: long-term follow-up of the HUNT 1 study. Atherosclerosis 212(2): 614–620
- 112. Volpe M, McKelvie R, Drexler H (2010) Hypertension as an Underlying Factor in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. The Journal of Clinical Hypertension 12(4): 277–283
- 113. Wachter R, Lüers C, Kleta S et al (2007) Impact of diabetes on left ventricular diastolic function in patients with arterial hypertension. European Journal of Heart Failure 9(5): 469–476
- 114. Wantha S, Alard J-E, Megens R T A et al (2013) Neutrophil-derived cathelicidin promotes adhesion of classical monocytes. Circulation Research 112(5): 792–801

- 115. Weber K T, Brilla C G (1991) Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. Circulation 83(6): 1849–1865
- 116. Westermann D, Lindner D, Kasner M et al (2011) Cardiac Inflammation Contributes to Changes in the Extracellular Matrix in Patients With Heart Failure and Normal Ejection Fraction. Circulation: Heart Failure 4(1): 44–52
- 117. Yiwen Li (2006) Treatment with G-CSF ameliorates chronic heart failure Li 2006.pdf. Laboratory Investigation (2006) 86, 32–44: 32–44
- 118. Yndestad A Role of inflammation in the progression of heart failure. Current Cardiology Reports 2007, 9:236-241c: 1–6
- 119. Zakeri R, Chamberlain A M, Roger V L et al (2013) Temporal relationship and prognostic significance of atrial fibrillation in heart failure patients with preserved ejection fraction: a community-based study. Circulation 128(10): 1085–1093
- 120. Zhang W, Lavine K J, Epelman S et al (2015) Necrotic myocardial cells release damage-associated molecular patterns that provoke fibroblast activation in vitro and trigger myocardial inflammation and fibrosis in vivo. J Am Heart Assoc 4(6): e001993
- 121. Zhaowei Ai Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes
- 122. Zile M R Plasma Biomarkers That Reflect Determinants of Matrix Composition Identify the Presence of Left Ventricular Hypertrophy and Diastolic Heart Failure. Circ Heart Fail. 2011 May ; 4(3):: 246–256
- 123. Zile M R (2002) New Concepts in Diastolic Dysfunction and Diastolic Heart Failure: Part II: Causal Mechanisms and Treatment. Circulation 105(12): 1503– 1508
- 124. Zile M R (2004) Diastolic Heart Failure Abnormalities in Active Relaxation and Passive Stiffness of the Left Ventricle. N Engl J Med 2004;350:1953-9.: 1953– 1959
- 125. Zile M R, Gaasch W H, Anand I S et al (2010) Mode of death in patients with heart failure and a preserved ejection fraction: results from the Irbesartan in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction Study (I-Preserve) trial. Circulation 121(12): 1393–1405
- 126. Zile M R, Baicu C F (2013) Biomarkers of Diastolic Dysfunction and Myocardial Fibrosis: Application to Heart Failure with a Preserved Ejection Fraction. J. of Cardiovasc. Trans. Res. 6(4): 501–515
- 127. Zile M R, Baicu C F, S. Ikonomidis J et al (2015) Myocardial Stiffness in Patients With Heart Failure and a Preserved Ejection Fraction: Contributions of Collagen and Titin. Circulation 131(14): 1247–1259

# 12. Anhang: Laborzubehör und Material

### 12.1 Laborgeräte

| Autoclav                                     | Systec GmbH, Wettenberg (VX-95)  |
|--|--|
| Bench  | Heraeus LamininAir, HLB 2448 GS  |
| Brutschrank                                  | Heraeus Med CO2-Auto-Zero 22001304   |
| CCD-Imagersystem                             | Bio-Rad Laboratories GmbH, München (ChemiDoc XRS)  |
| Cryostat                                     | Cryostat CM1950<br>Leica   |
| Digitalkamera                                | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (DFC 300 FX)  |
| Feinwaage                                    | Kern & Sohn GmbH, Balingen (ALJ 160-4NM)   |
| Fluoreszenzmikroskop                         | Fluoreszenzmikroskop DM-4000<br>Leica  |
| Gelelektrophoresekammer                      | Owl Separations Systems Inc., NH, USA (EasyCast <sup>™</sup> B1)   |
| Heizplatte + Magnetrührer                    | IKA Labortechnik GmbH & Co. KG, Staufen (RCT basic)  |
| Inkubator                                    | HERA Cell 150, Thermo Scientific<br>Thermo Scientific, Il 61101 USA  |
| Lichtmikroskop                               | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (DM 1000 LED)   |
| Lichtmikroskop mit<br>Fluoreszensvorrichtung | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (DM-RB)   |
| Mikrowellengerät                             | SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Sundern (MW 800)   |
| Nukleotidkonzentrationsmesser                | Thermo Fisher Scientific Inc, MA, USA (ND-1000)  |
| Objektive                                    | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar<br>(PL Fluotar 10x, 20x PH2, HI Plan 4x, HI Plan 10x, HI Plan<br>100x Öl, 25x Öl) |
| PCR-Cycler                                   | SensoQuest GmbH, Göttingen (Labcycler)   |
| pH-Meter                                     | Nova Analytics Corp., MA, USA (pH 526)   |
| Pipetten                                     | BRAND GMBH + CO KG, Wertheim (1000, 100, 10 μl)<br>Eppendorf Research AG, Hamburg, (1000, 100, 10, 2,5 μl)         |
| Powersupply                                  | Powerease <sub>TM</sub> Invitrogen<br>Invitrogen, Carlsbad, CA. (800) 603-7200                                     |

| PowerPac HC                | Biorad PowerPac   |
|----------------------------|---|
| PowerPac Basic             |   |
| Real Time PCR System       | 7500 Real Time PCR System                                   |
|                            | Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt (7500)       |
| Rollenmischer              | Karl Hecht KG, Sandheim (Assistent RM5)                     |
| Schwenktisch               | Grant Instruments Ltd, Großbritannien<br>(PMR 30)           |
| Spektralphotometer         | PEQLAB Biotechnologie GmbH                                  |
| NanoDrop                   | 91052 Erlangen  |
| Spülmaschine               | Miele & Cie. KG, Gütersloh (Mielabor G7783)                 |
| Schwingmühle               | Retsch GmbH, Haan (MM 301)                                  |
| Sterilisator               | Heraeus Holding GmbH, Hanau (T6060)                         |
| Thermoblock für PCR-Cycler | SensoQuest GmbH, Göttingen (Thermoblock 96)                 |
| Vortex                     | VF2 IKA® Werke GmbH & CO. KG, Staufen (K MS2<br>MINISHAKER) |
| Wasser- Aufbereiter        | Millipore GmbH, Schwalbach (Milli-Q Plus)                   |
| Zentrifuge                 | Eppendorf Centrifuge 5430R<br>22331 Hamburg                 |

Tabelle 12.1: Laborgeräte

## 12.2 Puffer und Lösungen

| Blockinglösung                | 1faches TBS, 1% (vol/vol) Tween 20, 5% (vol/vol)                  |
|-------------------------------|---|
|                               | Milchpulver   |
| Citratpuffer                  | 2, 1g Zitronensäure, 11 Aqua dest., (pH 6,0)                      |
| Collagenase Typ II            | CLS Charge 46 H 8863, # 4176                                      |
|                               | Cell Systems  |
| Fibronectinlösung             | F2006, Sigma  |
| DNase-Verdau                  | RNeasy Mini Kit, QUIAGEN 40724 Hilden QIAGEN                      |
| Penicillin/Streptomycin       | Precision Protein StrepTactin                                     |
|                               | HRP Conjugate   |
|                               | BIO-RAD   |
| PBS, 10-fach                  | 5 1 Aqua dest., 397,4 g NaCl, 10 g KCL, 10 g KH <sub>2</sub> PO4, |
|                               | 88,75 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - 2 H <sub>2</sub> O     |
| PFA                           | 100 ml PBS, 900 ml H <sub>2</sub> O, 40 g Paraformaldehyd, (pH    |
|                               | 7,4)  |
| Präparations-Puffer, (pH 7,4) | Saccharose 300mM, PMSF 1mM, PIPES 20mM, EDTA                      |
|                               | 10mM, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> $50$ mM                    |
| RLT- Puffer                   | RNeasy Mini Kit, QIAGEN 40724 Hilden                              |
| RW1- Puffer                   | RNeasy Mini Kit, QIAGEN 40724 Hilden                              |
| RPE- Puffer + Ethanol         | RNeasy Mini Kit, QIAGEN 40724 Hilden                              |

| RPMI 1640 Medium                  | CC-PRO GmbH                              |
|-----------------------------------|--|
|                                   | CC-Pro, 99986 Oberdorla                  |
| Tris-gepuffertes Salz Polysorbat/ | 1fach TBS, 1% Tween 20                   |
| Tween-20 (TBST)                   |  |
| Transferpuffer                    | NuPAGE Transfer Buffer (20x) NP0006-1    |
| _                                 | Invitrogen, Carlsbad, CA. (800) 603-7200 |
|                                   |  |
| Tris-Glycine- Ladepuffer          | Tris-Glycine SDS Running Buffer (10x)    |
|                                   | Invitrogen, Carlsbad, CA. (800) 603-7200 |
| Tween 20                          | P5927-100ml                              |
|                                   | SIGMA ALDRICH                            |

Tabelle 12.2: Puffer und Lösungen

#### 12.3 Verbrauchsmaterialien

| Carl Roth GmbH + Co, 76185 Karlsruhe                 |  |
|--|--|
|  |  |
| Sakura Finetek Europe B.V., Zoeherwoude, NL          |  |
| (Tissue-Tek)   |  |
| Safe-lock Tubes 0,5ml, 1ml, 1,5ml, 2ml               |  |
| Eppendorf AG, 22331 Hamburg                          |  |
| Schleier & Schuel GmbH, Dassel                       |  |
| (Folded Filters, 185mm)                              |  |
| Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen                  |  |
|  |  |
| Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen                  |  |
|  |  |
| Leica Microsystem GmbH, Wetzlar                      |  |
|  |  |
| Roti-NC,   |  |
| Carl Roth GmbH+ Co, 76185 Karlsruhe                  |  |
| Menzel Superfrost                                    |  |
| Menzel GmbH, Braunschweig                            |  |
| BRAND GmbH+ Co KG, Wertheim (1000, 100, 10µl)        |  |
| Eppendorf Research AG, Hamburg (1000, 100, 10µl)     |  |
| Eppendorf Research AG, Hamburg (1, 10, 100, 1000 ul) |  |
|  |  |
| CELLSTAR (5, 10, 25, 50 ml)                          |  |
| Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen                  |  |
| Criterion TGX  |  |
| Biorad   |  |
| Rotilabo®  |  |
| Carl Roth GmbH+ Co, 76185 Karlsruhe                  |  |
| Skirted 96 Well PCR Plate                            |  |
| Peqlab, 91052 Erlangen                               |  |
|  |  |

Tabelle 12.3: Verbrauchsmaterialien

#### 12.4 EDV-Programme

| Bildbearbeitung       | IM 500 Basis, Leica Microsystems GmBh, Wetzlar              |  |
|-----------------------|---|--|
|                       | ImageJ, Version 1.35j2, Open source                         |  |
|                       | GraphPadPrism 5 (GraphPad Software, Inc., CA, USA)          |  |
| Imager- Software      | ChemiDoc XRS  |  |
|                       | QuantityOne, Version 4.6.5                                  |  |
|                       | (BioRad Laboratories GmbH, München)                         |  |
| Literaturverarbeitung | Citavi 5 Swiss Academic Software                            |  |
| Textverarbeitung      | Adobe Photoshop CS6® Adobe Systems GmbH, Germany            |  |
|                       | Microsoft Excel® Microsoft, USA                             |  |
|                       | Microsoft Power Point® Microsoft, USA                       |  |
|                       | Microsoft Word® Microsoft, USA                              |  |
| Primer-Erstellung     | FastPCR 5.4 Professional                                    |  |
|                       | (http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/download.htm) |  |
| RT- Software          | Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt              |  |
|                       | (Software 7500 v2.0.2)                                      |  |
| Statistik             | IBM SPSS Statistics 22                                      |  |
|                       | GraphPadPrism 5 (GraphPad Software, Inc., CA, USA)          |  |

Tabelle 12.4: EDV-Programme

#### 12.5 Verzeichnis der immunhistologisch und im Western Blot verwendeten Antikörper

| Biotin- SP-      | Esel      | 1:1000 | Dianova GmbH, Hamburg      |
|------------------|-----------|--------|----------------------------|
| conjugated       |           |        |                            |
| Anti-Mouse IgG   |           |        |                            |
| Biotin- SP-      | Esel      | 1:1000 | Dianova GmbH, Hamburg      |
| conjugated       |           |        |                            |
| Anti-Rabbit IgG  |           |        |                            |
| Biotin- SP-      | Esel      | 1:1000 | Dianova GmbH, Hamburg      |
| conjugated       |           |        |                            |
| Anti-Rat IgG     |           |        |                            |
| CD68             | Ratte     | 1:200  | AbD Serotec                |
|                  |           |        |                            |
| Connexin43       | Kaninchen | 1:125  | ZYMED Laboratories         |
|                  |           |        | Invitrogen Immunodetection |
| Collagen I       | Kaninchen | 1:100  | 2150-1410, AbD Serotec     |
| Immunhistochemie |           |        |                            |
|                  |           |        |                            |
| Collagen I       | Maus      | 1:500  | C-2456, SIGMA, Missouri    |
| Western Blot     |           |        | 63103 USA                  |
|                  |           |        |                            |
| GAPDH            | Kaninchen | 1:1000 | 877-616-CELL (2355)        |
|                  |           |        | Cell Signaling             |

| NIMP-R14         | Ratte | 1:100 | (ab2557) Abcam               |
|------------------|-------|-------|------------------------------|
|                  |       |       | Cambridge CB4 0FL, UK        |
| Streptavidin-Cy2 | -     | 1:100 | Rockland, Gilbertsville, PA, |
|                  |       |       | USA                          |
| Streptavidin-Cy3 | -     | 1:300 | Rockland, Gilbertsville, PA, |
|                  |       |       | USA                          |

Tabelle 12.5: Verzeichnis der immunhistologisch und molekularbiologisch verwendeten Antikörper

## 12.6 Enzyme, Chemikalien und Reagenzien

| Albumin Fraktion V              | Carl Roth GmbH + co.KG, 76185 Karlsruhe            |
|---------------------------------|--|
| DNase-I (Turbo DNA free)        | Ambion, TX, USA                                    |
| Detektionskit                   | SuperSignal West Dura, Extended Duration Substrate |
| Chemilumineszenz                | Thermo Scientific, Il 61101 USA                    |
| 4',6-Diamidin-2-phenylindol     | 1:1000   |
| (DAPI)                          | Invitrogen GmbH, Karlsruhe                         |
| Destilliertes Wasser            | B. Braun Melsungen AG, Melsungen                   |
| DMSO (Dimethylsulfoxid)         | 100 ml # D 2650                                    |
|                                 | SIGMA ALDRICH                                      |
| ECL anti-rabbit IgG             | 1:2000, Esel                                       |
| (Enhanced chemiluminescence)    | GE Healtcare UK Limited, HP7 9NA UK                |
| Granulocytes-Colony-            | GRANOCYTE Lenograstim, 34 Millionen IE/ml          |
| Stimulating-factor (G-CSF)      | Chugai Pharma                                      |
| Homogenisierungspuffer          | 50mM TRIS-HCl pH 6,8, 20mM EDTA 5% SDS, 2,5        |
|                                 | mM DTT, 1mM AProtinin                              |
| Mowiol                          | Carl Roth GmbH + co.KG, 6185 Karlsruhe             |
| Picrosirius Red                 | 1:100  |
| "Direct Red 80"                 | Sigma Aldrich, 2610-10-8                           |
|                                 |  |
| Ponceau S Solution              | SIGMA- ALDRICH, Co.                                |
| Proteinase K                    | QIAGEN 40724 Hilden                                |
| Reduktionsmittel Dithiothreitol | NuPAGE Sample Reducing Agent                       |
| (DTT)                           | Invitrogen, Carlsbad, CA. (800) 603-7200           |
| Rekombinante Taq-DNA-           | Invitrogen GmbH, Karlsruhe                         |
| Polymerase                      |  |
| RNA-free Water                  | QIAGEN 40724 Hilden                                |
| Superscript II Reverse          | Invitrogen GmbH, Karlsruhe                         |
| Transcriptase                   |  |
| Transferpuffer                  | NuPAGE Transfer Buffer (20x) NP0006-1              |
| -                               | Invitrogen, Carlsbad, CA. (800) 603-7200           |
| Tris-Glycine- Ladepuffer        | Tris-Glycine SDS Running Buffer (10x)              |
|                                 | Invitrogen, Carlsbad, CA. (800) 603-7200           |
| Tween 20                        | P5927-100ml  |
|                                 | SIGMA ALDRICH                                      |

Tabelle 12.6: Enzyme, Chemikalien und Reagenzien

#### 12.7 Molekularbiologische Kits

| QIA Gen RNeasy Mini Kit                 | QIAGEN GmbH, Hilden                            |  |
|---|--|--|
| SYBR Green PCR Master Mix               | Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt |  |
| Taballa 12.7: Molakularhiologische Kits |  |  |

Tabelle 12.7: Molekularbiologische Kits

#### 12.8 Oligonukleotide/ Primer-Appendix

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma SIGMA Genosys (SIGMA Aldrich, Steinheim, Deutschland) bezogen.

| Primer          | Sequence (Forward, Reverse, 5'-3') | Product<br>Size, bp | TM          |
|-----------------|------------------------------------|---------------------|-------------|
| Mouse<br>BNP    | CAGCTCTTGAAGGACCAAGG               | 149                 | 62°C        |
|                 | CCGATCCGGTCTATCTTGTG               |                     |             |
| Mouse           | GCCGCTGATTCTTTTGACAT               | 111                 | 61°C        |
| CAMP            | ACCAATCTTCTCCCCACCTT               |                     |             |
| Mouse           | CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG          | 152                 | 60°C        |
| IL-1β           | GATCCACACTCTCCAGCTGCA              |                     |             |
| Mouse           | TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC               | 140                 | 56,5-62,5°C |
| IL-6            | GTGTAATTAAGCCCTCCGACTTG            |                     |             |
| Mouse           | TTTGAATTCCCTGGGTGAGAA              | 68                  | 60°C        |
| IL-10           | GGAGAAATCGATGACAGCGC               |                     |             |
| Mouse           | CAGGCCTGACATCTTCTGCAA              | 110                 | 60,5°C      |
| IL-18           | TCTGACATGGCAGCCATTGT               |                     |             |
| Mouse           | AGGTGTCCCAAAGAAGCTGTA              | 104                 | 60°C        |
| MCP-1/CCL-<br>2 | ATGTCTGGACCCATTCCTTCT              |                     |             |
| Mouse           | CCAGTGTGGGGAAGCTGTCTT              | 101                 | 59-61°C     |
| TNF-a           | AAGCAAAAGAGGAGGCAACA               |                     |             |
| Mouse           | CCGCTCAGTTGTGTCAAGAA               | 73                  | 61°C        |
| LTF             | TGGCATCAGCTCTGTTTCTC               |                     |             |
| Mouse           | TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC             | 156                 | 54,5-63,5   |
| GAPDH           | AAGATGGTGATGGGCTTCCCG              |                     |             |

Tabelle 12.8: Verzeichnis der verwendeten Oligonukleotide/Primer-Appendix

# 13. Erklärung zur Dissertation

"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, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. 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

# 14. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herr Prof. Dr. Christian Hamm für die herausragenden Forschungsmöglichkeiten im Labor der Kerckhoffklinik und die Überlassung dieses interessanten Projekts bedanken. Herrn Prof. Dr. Helge Möllmann und Herrn Prof. Dr. Holger Nef möchte ich ebenfalls für die Forschungsmöglichkeiten im Labor herzlich danken.

Besonders bedanke ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. ret. nat. Christian Troidl, für die vielen wertvollen Anregungen und die verlässliche Unterstützung sowie für das Korrigieren meiner Dissertation! Christian, du hast alles immer zusammengehalten. Ich bin dir unendlich dankbar!

Herrn Dr. Sebastian Szardien und Herrn MD, PhD Baktybek Kojonazarov möchte ich mich herzlich für die sorgfältige und umfangreiche Durchführung und Analyse der Echokardiographie bedanken!

Auch möchte ich mich herzlich bei unserer Tierärztin Frau Dr. vet. med. S. Voß bedanken, die fachlich stets mit Rat und Tat weiterhelfen konnte. Bei unseren TAs Frau A. Kirchhof, M. Rieschel, S. Sass und Frau O. Bechtgoldt möchte ich mich ebenso ganz herzlich für alle Hilfe, Ratschläge und die gute Stimmung im Doktorandenzimmer bedanken. Anett, wie viel Zeit haben wir mit Blotten und Radio hören verbracht, und Moni, wir im RT-Raum, und Sigrun mit den Mäusen, und Oxanna mit deiner Geduld beim Erstellen der Gefrierschnitte!

Zuletzt möchte ich Max und meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für die bedingungslose Unterstützung in allen Bereichen von Herzen danken!