

**Zelluläre Seneszenz im Myokard bei mitochondrialer Dysfunktion:
Neue Ansätze zum Verständnis von embryonaler und neonataler
Kardioprotektion und -regeneration**

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

vorgelegt von **Jan Philipp Häde**, geb. Schwarz
aus Gießen

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Kinderherzzentrum und Zentrum für angeborene Herzfehler
Zentrum für Kinderheilkunde
Abteilung Kinderkardiologie

Gutachter:

Prof. Dr. med. Christian Jux

Gutachter:

PD Dr. phil. nat. Christian Troidl

Tag der Disputation:

21.09.2022

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	STRESSRESISTENZ UND REGENERATION VON KARDIOMYOZYTEN	1
1.1.1	Die Bedeutung kardiovaskulärer Erkrankungen	1
1.1.2	Stressresistenz und Regeneration - Schwachstellen der Herzmuskelzellen	1
1.1.3	Vorbilder für Kardioprotektion und Regeneration	2
1.1.4	Das cHccs-Knockout-Modell	3
1.2	ZELLULÄRE SENESZENZ	4
1.2.1	Was ist zelluläre Seneszenz?	5
1.2.2	Die vielfältigen Funktionen zellulärer Seneszenz	5
1.2.3	Signalwege der zellulären Seneszenz	9
1.3	DAS CHCCS-KNOCKOUT-MODELL UND SENESZENZ	13
1.3.1	Das cHccs ^{+/-} -Herz zeigt Merkmale zellulärer Seneszenz	13
1.3.2	Inflammation, SASP und Regeneration	14
1.4	FRAGESTELLUNG	15
1.4.1	Hypothese	15
1.4.2	Methodik	16
1.4.3	Erhoffter Erkenntnisgewinn	17
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	MATERIAL	19
2.1.1	Laborgeräte	19
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	20
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	20
2.1.4	Puffer und Lösungen	21
2.1.5	Größenstandards	22
2.1.6	Enzyme und kommerzielle Kits	22
2.1.7	Inhibitoren	23
2.1.8	Sonstige Materialien für die Immunhistologie	23
2.1.9	Primer	23
2.1.10	Antikörper	24
2.1.11	Software und Online-Tools	25
2.2	METHODEN	25
2.2.1	Verwendete Mausstämme und Zucht	25
2.2.2	Tier- und Organpräparation	27
2.2.3	Genotypisierung	28
2.2.4	RNA-Expressionsanalyse	31

2.2.5	<i>Proteinanalysen</i>	35
2.2.6	<i>Histologie</i>	41
2.2.7	<i>Statistische Methoden</i>	45
3	ERGEBNISSE	46
3.1	INDUKTION DES SENESZENZPROGRAMMS	46
3.1.1	<i>γ-H2A.X weist auf aktivierte DDR im neonatalen cHccs^{+/-}-Herzen hin</i>	46
3.1.2	<i>Kein Hinweis auf Energiemangel als Auslöser zellulärer Seneszenz im neonatalen cHccs^{+/-}-Herzen</i>	48
3.1.3	<i>p53, zentraler Transkriptionsfaktor der DDR und zellulärer Seneszenz, ist im cHccs^{+/-}-Herzen unverändert</i>	50
3.2	SASP UND INFLAMMATION	52
3.2.1	<i>Kein Anhalt für veränderte Regulation des p38MAPK-Signalwegs in cHccs^{+/-}-Herzen</i>	53
3.2.2	<i>cHccs^{+/-}-Herzen und HCCS-defiziente-Zellen zeigen keine veränderte NFκB-Aktivierung, aber erhöhte IκBa-Spiegel</i>	54
3.2.3	<i>Zytokin-Level im cHccs^{+/-}-Herzen formell ohne signifikante Veränderung</i>	58
3.2.4	<i>Anzeichen für eine Aktivierung von STAT3 in HCCS-defizienten Kardiomyozyten</i>	62
3.2.5	<i>Interferon-γ und Interferon-stimulierte-Gene sind im neonatalen cHccs^{+/-}-Herzen stimuliert</i>	66
3.3	DIE SENESZENZ-ASSOZIIERTE β -GALAKTOSIDASE	69
3.3.1	<i>SABG lässt sich im cHccs^{+/-}-Herzen nicht nachweisen</i>	69
3.4	ZELLZYKLUSINHIBITION	71
3.4.1	<i>Der Zellzyklusinhibitor p21 ist im cHccs^{+/-}-Herzen induziert, aber unerwartet lokalisiert</i>	71
3.4.2	<i>p27 ist im Gegensatz zu p21 in cHccs^{+/-}-Herzen nicht verändert</i>	74
3.4.3	<i>p16^{Ink4a} ist im Zytoplasma von Hccs-KO-Kardiomyozyten verstärkt nachweisbar</i>	75
4	DISKUSSION	79
4.1	ZELLULÄRE SENESZENZ IM cHCCS ^{+/-} -HERZEN	79
4.1.1	<i>Zelluläre Seneszenz ist im embryonalen und neonatalen cHccs^{+/-}-Herzen nicht nachweisbar</i>	79
4.1.2	<i>Zelluläre Seneszenz im adulten Hccs-KO-Modell?</i>	81
4.2	INFLAMMATORISCHE SIGNALWEGE IM cHCCS ^{+/-} -HERZEN	82
4.2.1	<i>IκBa in Hccs-KO-Kardiomyozyten – Inhibition von NFκB oder intrinsischer Apoptose?</i>	82
4.2.2	<i>Complement Component C5a, CCL6, TIM-1, Thrombopoietin und RAGE – vielversprechende Kandidaten für weitere Untersuchungen im cHccs^{+/-}-Herzen</i> ...	83

4.2.3	<i>STAT3 und seine antiapoptotischen und antioxidativen Eigenschaften im cHccs^{+/-}-Herz</i>	92
4.2.4	<i>Die Rolle von Interferonen und damit assoziierter Gene im Hccs-KO-Modell</i>	94
4.3	FEHLENDE DDR-MARKER ALS MÖGLICHER HINWEIS AUF EINE SCHNELLE UND EFFIZIENTE DNA-REPARATUR IM <i>CHCCS^{+/-}</i> -HERZEN.....	96
4.4	MEHR ALS ZELLZYKLUSINHIBITION? DIE ROLLE VON CDKIS IM EMBRYONALEN UND NEONATALEN HERZEN.....	98
4.4.1	<i>Zytoplasmatische p16-Induktion als möglicher Kompensationsmechanismus in HCCS-defizienten Kardiomyozyten</i>	98
4.4.2	<i>Die zwei Gesichter von p21 - mögliche Implikationen für das Überleben HCCS-defizienter Kardiomyozyten</i>	100
4.5	LIMITATIONEN DER STUDIE.....	103
4.5.1	<i>Fokus auf zelluläre Seneszenz</i>	103
4.5.2	<i>Momentaufnahme dynamischer Prozesse</i>	103
4.5.3	<i>Limitationen einer Gesamtorgananalyse</i>	104
4.5.4	<i>Gesunde vs. KO-Zellen</i>	104
4.5.5	<i>Mögliche Einflussfaktoren des KO-Modells</i>	105
4.6	FAZIT UND AUSBLICK	105
	ZUSAMMENFASSUNG	IV
	SUMMARY	VI
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XI
	TABELLENVERZEICHNIS	XIII
	LITERATURVERZEICHNIS	XIV
	ANHANG	XXVII
	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	XXXII
	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	XXXIII
	DANKSAGUNG	XXXIV

1 Einleitung

1.1 Stressresistenz und Regeneration von Kardiomyozyten

1.1.1 Die Bedeutung kardiovaskulärer Erkrankungen

Weltweit sind Herz- und Kreislauferkrankungen seit Jahren führend auf der Liste der Todesursachen^{117,179}. Auch in Deutschland sind Erkrankungen des Herzens bei beiden Geschlechtern die häufigste Todesursache, sie verursachen mehr als ein Drittel aller Todesfälle. Neben dem akuten Myokardinfarkt spielen hierbei die chronisch ischämische Herzkrankheit und die Herzinsuffizienz eine bedeutende Rolle. Diese beiden chronischen Herzerkrankungen sind allein für über 10% der Todesfälle in Deutschland verantwortlich¹⁶⁵. Aufgrund ihrer hohen Krankheitslast und der damit verbundenen persönlichen und volkswirtschaftlichen Lasten sind Erkrankungen des Herz- und Kreislaufsystems ein zentrales Thema der medizinischen Forschung.

1.1.2 Stressresistenz und Regeneration - Schwachstellen der Herzmuskelzellen

Mit ursächlich für die hohe Mortalität und Morbidität kardialer Erkrankungen ist die ausgeprägte Stressanfälligkeit menschlicher Herzmuskelzellen und ihre geringe Kapazität zur Regeneration⁹⁷. Der Untergang von Herzmuskelzellen, sei es durch akute Ischämie bei Herzinfarkt, chronische Überbelastung bei Hypertension oder durch Entzündung bei Myokarditis, führt zu pathologischem Remodelling: Durch den Ersatz von gesundem Herzgewebe durch fibrotische Narben und exzentrischer Hypertrophie trägt das Herz einen bleibenden Schaden davon⁸. Eine ausgeprägte Fähigkeit zur Selbstheilung, die andere Organe des menschlichen Körpers auszeichnet, kann das Herz dabei nicht aufweisen. Dies liegt vor allem an der geringen bis nicht existenten Proliferationsfähigkeit adulter, differenzierter Kardiomyozyten^{9,50,97}. Diese beiden Schwachpunkte des Herzgewebes, sowohl die hohe Stressanfälligkeit als auch die äußerst geringe Fähigkeit zur Regeneration, sind aufgrund der immensen Bedeutung kardialer Erkrankungen ein wichtiges Forschungsfeld. Der Schutz von Kardiomyozyten durch Verbesserung ihrer Widerstandsfähigkeit als auch die Wiederherstellung gesunden Herzmuskelgewebes durch Regeneration sind somit wichtige Ansatzpunkte auf dem Weg zu besserer Prävention und Therapie von Herzerkrankungen. Hinsichtlich der Regeneration existieren dazu verschiedene Ansätze: Neben der Therapie mit Stammzellen (kardial oder extrakardial) wird vor allem auch versucht, die nicht

vorhandene bis geringe Proliferationsrate von Kardiomyozyten künstlich zu stimulieren⁵⁰. Mit letzterem Ansatz soll sich diese Arbeit vor allem auseinandersetzen.

1.1.3 Vorbilder für Kardioprotektion und Regeneration

Sowohl für hohe Stressresistenz als auch Regeneration des Herzens durch gesteigerte Kardiomyozyten-Proliferation gibt es verschiedene „Vorbilder“. So weisen verschiedene Studien darauf hin, dass pränatale Kardiomyozyten besser mit Stress umgehen können als adulte Kardiomyozyten: Sie zeigen bei Transplantation in geschädigtes adultes Myokard ein deutlich besseres Überleben und Einwachsen als adulte Zellen¹⁴⁰. Adulte Kardiomyozyten wiederum scheinen unter bestimmten Umständen ihre Stressresistenz durch Entdifferenzierung und Expression fetaler Merkmale zu erhöhen^{7,46,94,139}.

Bei bisher noch unzureichender Datenlage kann zwar nicht pauschal von einer höheren Stressresistenz embryonaler Kardiomyozyten gesprochen werden. Dennoch weisen die oben genannten Beispiele darauf hin, dass adulte Kardiomyozyten protektive Mechanismen der Pränatalzeit während ihrer Differenzierung verlieren. Eine Reaktivierung dieser Mechanismen stellt also eine Möglichkeit dar, adulte Kardiomyozyten widerstandsfähiger gegen Stress zu machen.

In Bezug auf Regeneration und Proliferation können andere Spezies als „Vorbild“ für das menschliche Herz gesehen werden. Diese weisen teilweise eine deutlich höhere Regenerationskapazität des Herzens auf. So können adulte Zebrafische die apikale Resektion von Herzmuskelgewebe komplett durch erhöhte Proliferation vorhandener Kardiomyozyten kompensieren¹³⁸. Bei Säugetieren zeigen Nager wie Maus und Ratte im Vergleich zum Menschen erstaunliche Fähigkeiten zur Wiederherstellung kardialen Gewebes nach mechanischer, pharmakologischer und genetischer Schädigung. Auch hier kommt es zu gesteigerter Proliferation von Kardiomyozyten. Im Gegensatz zu den erstgenannten Spezies scheint die Fähigkeit zur Proliferation und Regeneration hier nach allen bisher erhobenen Daten auf frühe postnatale Stadien beschränkt zu sein. Dennoch besteht die begründete Hoffnung, dass auch im menschlichen Herzen ein regeneratives Potential konserviert ist, das durch externe Stimuli abrufbar sein könnte^{2,50,86,175}.

Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen, die den oben genannten „Vorbildern“ eine erhöhte Stressresistenz und Regenerationsfähigkeit ermöglichen, soll dazu dienen, letztendlich die Ziele verbesserter Kardioprotektion und Regeneration des menschlichen Herzens durch therapeutische Intervention zu erreichen.

1.1.4 Das *cHccs*-Knockout-Modell

2008 stellten Drenckhahn und Kollegen ein Mausmodell vor, das dabei helfen kann, diese molekularen Mechanismen besser zu verstehen⁴⁷. Gekoppelt an ein Entwicklungsgen der Herzentwicklung wird in diesem Modell das Gen der Holocytochrom-C-Synthetase (HCCS) ausgeschaltet. Dies führt in kardialen Zellen zu einer gestörten Aktivierung der Elektronentransporter Cytochrom c (CytC) und c1. Cytochrom c1 ist Bestandteil von Komplex III der Atmungskette und transferiert ein Elektron von Ubiquinol zu Cytochrom c, das wiederum Elektronen von Komplex III der Atmungskette zu Komplex IV transferiert¹⁶⁰. Das HCCS kodierende *Hccs*-Gen liegt X-chromosomal – dies führt dazu, dass im Herzen homozygoter Weibchen (*cHccs*^{-/-}, c für *cardiac*) und hemizygoter Männchen (*cHccs*^{y/-}) kein CytC gebildet wird und der Atmungskettendefekt alle kardialen Zellen betrifft. Die betroffenen Tiere sterben intrauterin. Bei heterozygoten Weibchen (*cHccs*^{+/-}) ist dagegen ein funktionstüchtiges Genallel vorhanden. Durch die zufällige Inaktivierung eines X-Chromosoms, den physiologischen Vorgang in weiblichen Körperzellen zum Ausgleich des Genmaterials, entsteht bei ihnen ein Mosaik aus „gesunden“ und HCCS-defizienten Herzzellen (für eine detailliertere Darstellung des Mausmodells s. 2.2.1). Zur Mitte der Gestation sind bei diesen Tieren im Herzen 50% des Zellvolumens gesund, die andere Hälfte exprimiert kein HCCS, kann somit kein Cytochrom c und c1 bilden und weist damit einen Defekt der Atmungskette auf.

Diese Schädigung des Herzmuskels wird im weiteren Verlauf bis zur Geburt allerdings durch eine erhöhte Proliferation der gesunden Zellen kompensiert. Infolge dieser Hyperproliferation machen die *Hccs*-defizienten Kardiomyozyten bei Geburt nur noch ein Zehntel des Myokard-Volumens aus. Das Herz der *cHccs*^{+/-}-Mäuse ist zunächst hypoplastisch, aber voll funktionsfähig. Die Hypoplasie wird zudem im weiteren postnatalen Verlauf durch Hypertrophie der Kardiomyozyten ausgeglichen.

Bemerkenswerterweise kommt es im Verlauf nicht zum Zelltod der geschädigten, HCCS-defizienten Zellen. Diese Knockout(KO)-Zellen bleiben vielmehr in allen untersuchten Stadien – also zumindest bis ins adulte, einjährige *cHccs*^{+/-}-Herz – vorhanden⁴⁷. Die KO-Zellen aktivieren dabei während der Embryonalphase zahlreiche protektive Mechanismen wie die mitochondriale UPR (*unfolded protein response*), antiapoptotische Mechanismen und Schutzmechanismen gegen reaktive Sauerstoffmetaboliten (*reactive oxygen species, ROS*)¹¹⁰. Ob das Überleben der defekten Zellen notwendige Voraussetzung für die Hyperproliferation der gesunden Zellen ist oder

zum Beispiel „nur“ zur Bewahrung der Organintegrität notwendig ist, konnte bisher nicht geklärt werden. Ein solches Zusammenspiel wäre von großem Interesse, da es eine Form der Induktion von oder zumindest ein unterstützendes Milieu für regenerative Proliferation darstellen würde. Die entsprechenden Mechanismen könnten möglicherweise therapeutisch nutzbar gemacht werden.

Zusammenfassend zeigt das *cHccs*-KO-Modell sowohl Regeneration (durch die gesunden Zellen) als auch Kardioprotektion (in den *Hccs*-KO-Zellen) und ermöglicht Untersuchungen der molekularen Abläufe und des Zusammenspiels der beiden Mechanismen.

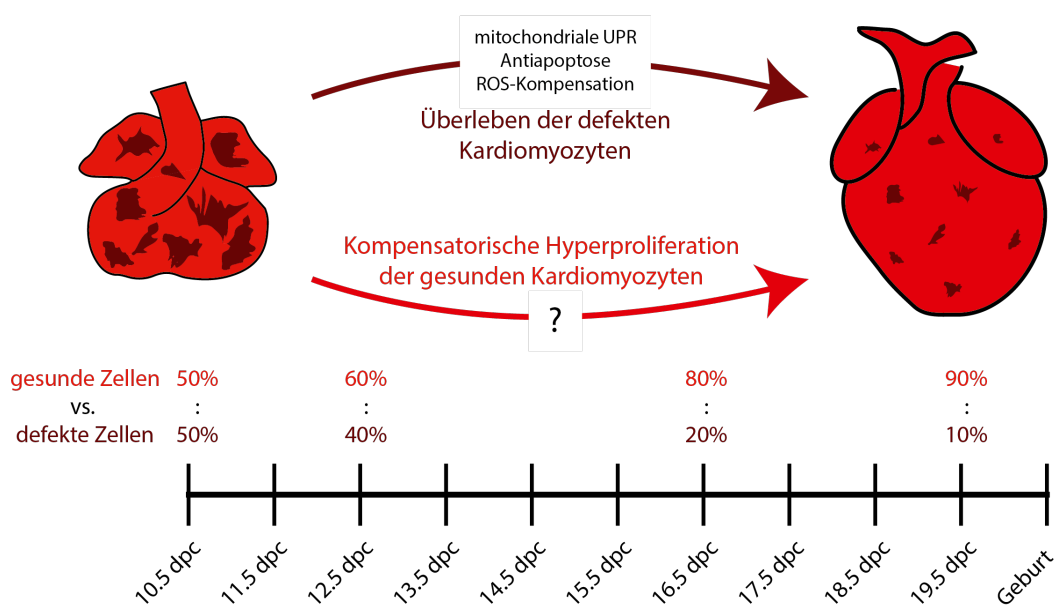


Abbildung 1: Regeneration des embryonalen Herzens im *cHccs*-KO-Modell im Verlauf der zweiten Gestationshälfte

Der herzkonditionale *Hccs*-Knockout erzeugt im Herzen heterozygoter Weibchen in der ersten Hälfte der Gestation ein Mosaik aus gesunden Zellen und Zellen mit defekter Atmungskette. Die defekten Zellen aktivieren zahlreiche Schutzmechanismen und überleben, während der genetisch induzierte Verlust voll funktionstüchtiger Kardiomyozyten im Verlauf durch Hyperproliferation der gesunden Kardiomyozyten kompensiert wird. Die Mechanismen, die zu dieser Hyperproliferation führen, sind bisher nicht geklärt („?“) Dadurch verändert sich im Laufe der Gestation das Volumenverhältnis der beiden Zellpopulationen (Zeitstrahl, Volumen in Prozent). Das Modell weist also sowohl zytoprotektive Mechanismen (oberer Pfeil) als auch regenerative Fähigkeiten (unterer Pfeil) auf. dpc = days post conceptionem, Tage nach Befruchtung der Eizelle. Abbildung modifiziert nach Magarin et al.¹¹¹

1.2 Zelluläre Seneszenz

Am Schnittpunkt der Themen zelluläre Stressreaktion und Regeneration findet sich ein Phänomen, das in den letzten Jahren immer stärker in den Fokus der Forschung gerückt ist: zelluläre Seneszenz. Ursprünglich als innere Uhr der Zelle primär im Kontext von Altern untersucht und verstanden, weitet das zunehmende Wissen über diesen Schutzmechanismus der Zelle in den letzten Jahren den Blick auf deutlich vielfältigere

Funktionen. Worum handelt es sich bei diesem Vorgang und was hat dies mit der Regeneration und Stressanfälligkeit des Herzens zu tun?

1.2.1 Was ist zelluläre Seneszenz?

Zelluläre Seneszenz (von lat. *senescere*, „altern“) beschreibt den irreversiblen Austritt einer Zelle aus dem Zellzyklus aufgrund verschiedener, größtenteils schädigender Stimuli^{4,72,127}. Der Unterschied zur Quieszenz, dem Ruhestatus teilungsfähiger Zellen, besteht in der Irreversibilität des Proliferationsstopps: Mitogene – zur Teilung anregende - Stimuli zeigen bei seneszenten Zellen keine Wirkung⁷². Dabei ist Seneszenz keine Vorstufe des regulierten Zelltodes (Apoptose), wie man aufgrund der schädigenden Auslöser vermuten könnte. Es handelt sich bei Apoptose und zellulärer Seneszenz vielmehr um alternative Reaktionen auf Zellstress²⁸. Bemerkenswerterweise zeigen verschiedene seneszente Zellen sogar eine Resistenz gegenüber apoptotischen Signalen^{113,147,181,193}. Seneszente Zellen werden durch das Immunsystem entfernt⁷², können aber auch sehr lange im Gewebe erhalten bleiben und akkumulieren dabei im Alter²¹. Sie zeigen in Kultur häufig eine veränderte (abgeflachte und vergrößerte) Zellmorphologie, vor allem aber auch einen weiterhin aktiven Stoffwechsel, der sich von ihren quieszenten Nachbarn unterscheidet. Teil dieses veränderten Stoffwechsels ist ein typischer sekretorischer Phänotyp, der *senescence associated secretory phenotype* (SASP). Er setzt sich aus verschiedensten Zytokinen zusammen und hat in den unterschiedlichen Zusammenhängen, in denen zelluläre Seneszenz auftritt, ausgeprägt heterogene Auswirkungen^{31,112} (s. Abbildung 2).

1.2.2 Die vielfältigen Funktionen zellulärer Seneszenz

1.2.2.1 Seneszenz als Schutz vor maligner Entartung

Nach der Erstbeschreibung der zellulären Seneszenz durch Hayflick und Moorhead 1961⁷⁰ wurden nach und nach immer vielfältigere Auslöser zellulärer Seneszenz bekannt. Aufgrund der Heterogenität der Stimuli und ihrer Begleitumstände ist die Einteilung dieser Auslöser schwierig und unterscheidet sich je nach Quelle^{4,72,127}. Die zuerst durch Hayflick und Moorhead beschriebene Seneszenz wird als *replikative Seneszenz* (RS) bezeichnet. Sie beruht auf der Verkürzung der Telomere bei jeder Zellteilung. Nach einer limitierten Anzahl von Zellteilungen kommt es zum Verlust der Telomere und damit zu freiliegenden Desoxyribonukleinsäure(DNA)-Doppelsträngen⁶⁸. Diese werden von einem Schutzmechanismus, der sogenannten *DNA damage response* (DDR) erkannt, die letztendlich den Zellzyklusaustritt einleitet⁵² (s. 1.2.3.1).

Auch wenn der Verlust der Telomere bei der RS gewissermaßen einen Zellstress darstellt, wird diese aufgrund ihres langsamen, chronischen Verlaufs unterschieden von den eher akuten Verläufen der *Stress-induzierten Seneszenz*. Verschiedene Stressoren führen hier, häufig über DNA-Schäden (insbesondere Doppelstrangbrüche) und die DDR vermittelt, zum Zellzyklusaustritt. Man kann dabei zwischen intrinsischen und extrinsischen Stressoren unterscheiden. Zu den intrinsischen Stressoren gehören unter anderem oxidative Schäden, wie sie zum Beispiel durch mitochondriale Dysfunktion hervorgerufen werden können^{128,178,184} und Hyperproliferation, die zur Akkumulation von DNA-Schäden führt und durch aktivierte Onkogene hervorgerufen werden kann (auch gesondert als *Onkogen-induzierte Seneszenz* bezeichnet)^{14,123}. Im weiteren Sinn ist auch die replikative Seneszenz eine durch intrinsischen Stress getriggerte Seneszenz, da der Telomerverlust zu freiliegenden Doppelsträngen führt und die DDR aktiviert⁵². Beispiele für extrinsische Faktoren sind ionisierende Strahlung⁴³ und Chemotherapeutika wie Doxorubicin²⁴ oder Bleomycin¹⁴².

Replikative und stressinduzierte Seneszenz haben eine primär protektive Funktion: Zellen mit geschädigter DNA oder drohender Entartung werden durch die Induktion des Seneszenzprogramms aus dem Zellzyklus genommen. Damit wird verhindert, dass sich aus diesen Läsionen maligne, entartete Zellen entwickeln^{72,95,143}. Die große Bedeutung dieser Funktion zeigt sich darin, dass Mutationen von zwei wesentlichen Faktoren der Seneszenzkaskade – p53 und p16 (s. 1.2.3.2) – zu den häufigsten Mutationen in malignen Tumoren gehören⁴. Der SASP trägt zu dieser Schutzfunktion gegen Entartung bei, indem er durch seine parakrine Funktion in umliegenden, ebenfalls potentiell geschädigten Zellen Seneszenz induziert. Es kommt zu einer Aktivierung des Immunsystems, das letztendlich die geschädigten Zellen entfernt^{84,190}. Die primär schützende Funktion des SASP kann aber auch unter bestimmten Umständen negative Auswirkungen haben. So konnte gezeigt werden, dass das proinflammatorische Milieu des SASP vorgeschädigte Zellen auch zur Proliferation und Entartung anregen und die Aktivierung des Immunsystems bei Persistenz der seneszenten Zellen zu chronischen Entzündungszuständen führen kann^{31,56,93,194}. Die Akkumulation seneszenten Zellen durch replikative und stressinduzierte Seneszenz als tumorsuppressive Mechanismen wird deswegen häufig als ein Beispiel für „antagonistische Pleiotropie“ verwendet^{4,20}: Eine im jungen Alter schützende Funktion hat im Alter negative, teilweise sogar gegenteilige Auswirkungen. So tragen im Alter kumulierende seneszenten Zellen durch den Verlust ihrer eigentlichen Funktion und durch den SASP auch zu schädlichen

Altersprozessen bei, was durch senolytische (gezielte Entfernung seneszenten Zellen durch Pharmaka) und SASP-inhibierende Eingriffe gezeigt werden konnte²⁰.

1.2.2.2 „Neue“ Funktionen der Seneszenz

Die „neuen“, nach und nach entdeckten Funktionen des Seneszenz-Programms gehen über den Mutationsschutz der „klassischen“ Seneszenz hinaus. So konnten in zahlreichen Geweben – unter anderem auch dem Herzen – seneszente Zellen während der Embryonalentwicklung nachgewiesen werden^{109,126,167}. Ähnlich zur programmierten Apoptose der Embryonalentwicklung, die während der Organogenese für die Entfernung überflüssiger Zellen verantwortlich ist¹¹⁹, scheint Seneszenz hier eine programmierte Funktion zu haben. Es handelt sich hier um eine sogenannte *transiente* Form der Seneszenz: Die seneszenten Zellen persistieren nicht lange im Gewebe, sondern sind im Verlauf schnell nicht mehr nachweisbar. Storer et al. und Muñoz-Espín et al. zeigen dabei, dass Apoptose und Makrophagen-Clearance für das Verschwinden der transient seneszenten Zellen verantwortlich sind^{126,167}.

Besonders von Interesse für die vorliegende Arbeit sind vor allem relativ neue Untersuchungen, die eine positive Rolle des Seneszenzprogramms und des SASP im Zusammenhang mit Organschädigung und -regeneration zeigen. So vermindern seneszente Zellen SASP-vermittelt fibrotisches Remodelling und somit einen Funktionsverlust in der chemisch geschädigten Leber⁹², in Hautwunden⁸³ und vor allem auch im Herzen, sowohl nach Infarkt^{35,157}, experimentell induzierter Hypertrophie als auch genetisch induzierter Kardiomyopathie¹²². Der SASP trägt zudem zur schnellen Wundheilung der Haut bei⁴². Auch bei diesen Beispielen handelt es sich um ein transientes Auftreten seneszenten Zellen. Abbildung 2 gibt einen Überblick über Auslöser und Funktion zellulärer Seneszenz.

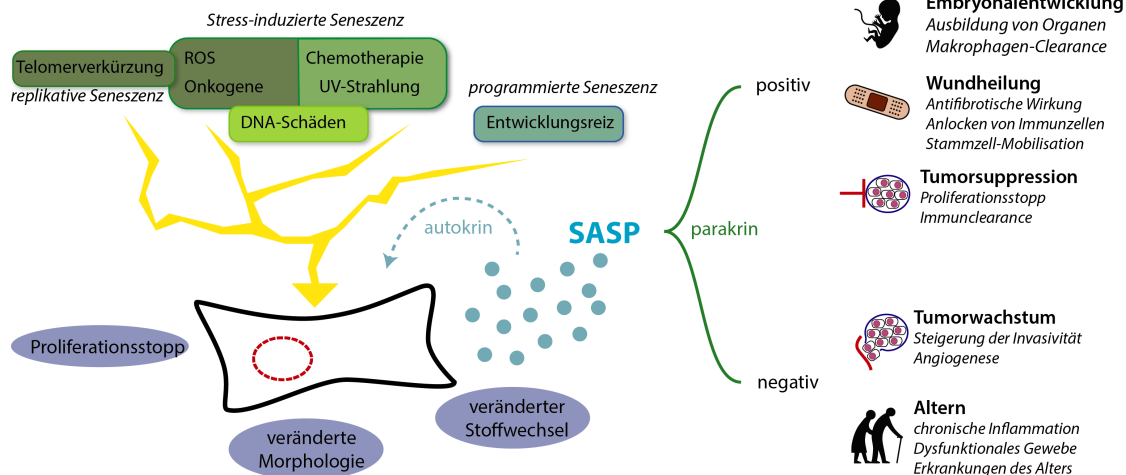


Abbildung 2: Auslöser und Funktionen der zellulären Seneszenz

Die Grafik zeigt einen Überblick über die verschiedenen Ursachen der Seneszenz (abgerundete grüne Rechtecke), die prominentesten Veränderungen seneszenten Zellen (ovale blaue Kästen) und die unterschiedlichen Funktionen des SASP und der zellulären Seneszenz (rechter Bildteil). Sowohl Auslöser als auch Auswirkungen zeigen dabei die vielfältigen Möglichkeiten der Entstehung und Folgen zellulärer Seneszenz. Welche davon konkret zutreffen, ist kontextabhängig. Details siehe 1.2.1 und 1.2.2. Abbildung adaptiert nach Herranz et al. und Malaquin et al.^{72,112}

1.2.2.3 Zelluläre Seneszenz im Herzen

In der Herzforschung herrschte lange Zeit ein Verständnis von zellulärer Seneszenz als Mechanismus, der negativ zu Alterserscheinungen beiträgt, vor. So schreiben Siddiqi und Sussman noch 2013, dass „vielleicht das wichtigste Merkmal seneszenten Zellen [...] die Unfähigkeit zu Wundheilung und Regeneration und Aufrechterhaltung normaler Homöostase“ sei¹⁵⁹. Dieser Einschätzung widersprechen Untersuchungen aus jüngerer Vergangenheit, die auch im Herzen „neue“ Funktionen zellulärer Seneszenz gefunden haben.

Zum einen zeigen Lorda-Diez et al., dass auch bei der Bildung des Herzens während der Embryonalphase seneszenten Zellen nachgewiesen werden können. Wie unter 1.2.2.2 bereits beschrieben, scheint Seneszenz hier eine ähnliche Funktion wie die regulierte Apoptose im Rahmen der Organogenese auszuüben¹⁰⁹.

Auch bei Herzschädigung und -regeneration weisen neue Arbeiten einen positiven Einfluss seneszenten Zellen nach: Feng Teng et al. konnten das Vorkommen zellulärer Seneszenz bei der Regeneration des neonatalen Mausherzens nach apikaler Spitzenresektion zeigen. Hierbei wird nach chirurgischer Resektion der Herzspitze im umgebenden Gewebe durch Kardiomyozyten vermittelt in benachbarten Fibroblasten Seneszenz ausgelöst. Die Inhibition zellulärer Seneszenz über p53-Inhibition verschlechterte die Wundheilung und reduzierte die regenerative Proliferation von Kardiomyozyten. Die Autoren postulieren letztlich, dass Fibroblasten-Seneszenz nach

apikaler Resektion somit die neonatale Regeneration des geschädigten Herzens fördert, indem der fibrotische Umbau des Herzens durch Fibroblasten vermindert wird⁵⁵. In einer ähnlichen Arbeit konnten transient seneszente kardiale Fibroblasten im durch Resektion oder Infarkt geschädigten neonatalen Mausherzen und Zebrafischherzen nachgewiesen werden¹⁴⁹. Auch im adulten Herzen konnten positive Effekte seneszenten Fibroblasten, bemerkenswerterweise aber auch seneszenten Kardiomyozyten beobachtet werden: Hier reduziert die auftretende Seneszenz das fibrotische Remodelling nach Infarkt^{35,157}.

1.2.3 Signalwege der zellulären Seneszenz

Die Komplexität der verschiedenen Funktionen zellulärer Seneszenz spiegelt sich auch in den daran beteiligten molekularen Signalwegen wider. Abhängig vom Kontext unterscheiden sich die Signalkaskaden, die letztendlich zum Zellzyklusaustritt führen, teils deutlich voneinander, teils sind sie eng miteinander verzahnt. Gleiches gilt auch für die Aktivierung des SASP, dessen molekulare Mechanismen zudem größtenteils noch unklar sind. Im Folgenden sollen einige wesentliche Signalwege zellulärer Seneszenz dargestellt werden.

1.2.3.1 Zellzyklusaustritt im Rahmen der DNA-Damage-Response

Die DDR überwacht die DNA einer Zelle und leitet im Falle eines DNA-Schadens eine Signalkaskade ein, die die Reparatur der DNA zum Ziel hat. Wesentlicher Bestandteil der DDR ist die Vermittlung des (zunächst temporären) Austritts aus dem Zellzyklus. Dies verhindert die Vermehrung geschädigter DNA und gibt den Reparaturmechanismen der Zelle Zeit zur Korrektur der DNA-Schäden. Kann der Schaden durch die zelleigenen Reparaturmechanismen repariert werden, wird der Zellzyklus fortgesetzt. Gelingt dies nicht, werden Seneszenz oder Apoptose eingeleitet. Warum welches Programm – Seneszenz oder Apoptose – eingeleitet wird, ist immer noch unklar, vermutet wird ein Einfluss von Dauer, Schwere und Art des Schadens^{4,28}. Zentrale Proteine des DDR-vermittelten Zellzyklusaustritts sind ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) und ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3-related*), zwei Serin/Threonin-Kinasen. ATM bindet an Doppelstrangbrüche, ATR wiederum an Einzelstrangbrüche der DNA. ATM und ATR sind miteinander verknüpft und aktivieren sich gegenseitig. Beide phosphorylieren das Histon H2A.X, was die lokale DDR-Antwort verstärkt. Durch ATM und ATR werden die beiden Checkpoint-Kinasen 1 und 2 (Chk1, Chk2) aktiviert, was wiederum p53 stabilisiert. Dies geschieht durch Inhibition von *Mouse double minute 2* (MDM2), dessen Bindung an p53 für dessen proteasomalen Abbau verantwortlich ist^{21,72}.

1.2.3.2 Die Schlüsselspieler der Zellzyklusinhibition: p53/p21 und p16/Rb

p53 ist als *Wächter des Genoms* bekannt⁹⁹, was auf seine tragende Rolle beim Schutz der DNA-Integrität hinweist. p53 ist ein Transkriptionsfaktor und induziert die Transkription des CDK(*cyclin dependent kinase*)-Inhibitors (CDKI) p21^{CDKN1a} (im weiteren p21 genannt). Dieser hemmt CDK2, verhindert damit die Phosphorylierung von Rb (*retinoblastoma protein*) und somit die Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F, was den Übergang des Zellzyklus von der G1- in die S-Phase verhindert¹⁸³(s. Abbildung 3). Zusätzlich kann p21 PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) und damit die DNA-Synthese inhibieren¹³³. Die Aktivierung von p21 im Rahmen der DDR führt zunächst nicht zum *irreversiblen* Zellzyklusaustritt. Dieser wird erst bei anhaltendem DDR-Signal induziert und häufig durch die Induktion eines anderen CDKI, p16^{Ink4a} (im weiteren p16 genannt) angezeigt⁷². p21 vermittelt auch die transiente Seneszenz in der Embryonalentwicklung. Dies geschieht unabhängig von p53 über *Transforming growth factor β*/SMAD- und Phosphoinositid-3-Kinasen/*Forkhead box O3*-Signalwege⁴ (s. Abbildung 3).

p16 kann ebenfalls von DDR-Signalen aktiviert werden, dies geschieht aber häufig verzögert zum p53/p21-Signalweg und erst bei persistierendem DNA-Schaden^{21,72,166}. Der p16-Signalweg induziert primär Zellstress-vermittelte Seneszenz²¹. Im Gegensatz zu p21 vermittelt ein über Tage anhaltendes p16-Signal einen irreversiblen Zellzyklusaustritt¹⁵. p16 blockiert CDK4/6, verhindert damit wie p21 die Phosphorylierung von Rb und stoppt somit den Zellzyklus¹⁵⁴(s. Abbildung 3). Sowohl p16 als auch p21 können diesen Zellzyklusstopp eigenständig vermitteln, auch wenn sie eng miteinander verwoben sind⁴.

1.2.3.3 SASP-Masterregulator: Der NFκB-Komplex

Die Regulation des SASP ist in großen Teilen noch unzureichend beschrieben¹¹². Eine Schlüsselrolle scheint dem Proteinkomplex NFκB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) zuzukommen^{26,146}. Bei NFκB handelt es sich um eine Proteinfamilie aus fünf verschiedenen Proteinen, die in Form von Hetero- oder Homodimere als Transkriptionsfaktor eine regulatorische Funktion vieler essentieller Stoffwechselwege, u.a. Inflammation, Wachstum, und Stressantwort, ausüben. Für eine Darstellung der komplexen Regulation von NFκB im Rahmen von Seneszenz und dem SASP sei auf das Review von *Salminen et al.*¹⁴⁶ verwiesen, hier soll nur in Kürze auf Wesentliches eingegangen werden. NFκB wird ubiquitär exprimiert und liegt in den

meisten Zellen durch Bindung an I κ B (*Inhibitor of NF κ B*) inaktiviert im Zytosol vor. Die Aktivierung und konsekutive Translokation in den Nukleus erfolgt primär über den sogenannten kanonischen Signalweg. In ihm wird durch Phosphorylierung von I κ B durch den I κ B-Kinase-Komplex (IKK) der proteasomale Abbau von I κ B induziert, was durch Freilegen der Kernlokalisierungssequenz zur nukleären Translokation von NF κ B führt¹⁷⁷. NF κ B kann u.a. durch verschiedene Zytokine aktiviert werden, ist aber auch über das sogenannte NEMO (*NF κ B essential modifier*)-Shuttle mit ATM und somit der DDR verbunden (s. Abbildung 3). Im Zellkern fungiert NF κ B als Transkriptionsfaktor für verschiedene Zytokine des SASP¹⁴⁶.

1.2.3.4 Verbindendes Element zwischen Zellstress und SASP: p38MAPK

Neben der Ablösung von I κ B wird die transkriptionelle Aktivität von NF κ B auch durch andere Proteinmodifikationen, vor allem Phosphorylierungen gesteuert¹³². Diese wird neben anderen Kinasen auch durch *p38 mitogen-activated protein kinasen* (p38MAPK) katalysiert. p38MAPK nehmen eine zentrale Rolle in zellulärer Seneszenz und dem SASP ein. Sie werden sowohl durch DNA-Schäden und den DDR, andere Zellstressoren wie oxidativen und metabolischen Stress als auch inflammatorische Zytokine aktiviert^{34,59,134}. Die Aktivierung von p38MAPK induziert mittels NF κ B-Aktivierung den SASP in humanen Fibroblasten, Inhibition von p38MAPK supprimiert wiederum den SASP⁵⁹. Neben der Regulation der NF κ B-Aktivität zeigte sich in menschlichen Tumorzellen *in vitro* zudem, dass p38MAPK den SASP posttranskriptionell durch mRNA-Stabilisierung von SASP-Zytokinen zu regulieren scheint¹.

1.2.3.5 Zytokine des SASP

Der SASP setzt sich aus verschiedenen inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Proteasen zusammen. Wie bereits erwähnt ist er in seiner Wirkung und Zusammensetzung stark von Zelltyp und Stimulus abhängig. Eine ausführliche Auflistung aller möglichen Botenstoffe des SASP ist somit schwer möglich und auch nicht zielführend^{32,72,112}. Hier soll deswegen nur ein Überblick über die prominentesten Bestandteile des SASP gegeben werden. Wichtigster Marker des „reifen“ SASP ist das proinflammatorische Zytokin Interleukin 6 (IL-6)³¹. Es aktiviert über seinen Rezeptor u.a. die JAK-STAT-Signalkaskade (JAK – Januskinase, STAT - *signal transducer and activator of transcription*) und ist neben seiner tragenden Rolle in der Inflammation auch an Proliferation und Regeneration beteiligt^{65,144,173}. Interleukin 1 α / β sind Zytokine des frühen SASP und verstärken u.a. im Sinne eines autokrinen Feedbacks

den SASP¹¹². Weitere prominente Botenstoffe des SASP sind Chemokine wie IL-8, *growth regulated oncogene α* und *β* (Synonyme *chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)*-8, -1 und -2), *Chemokine ligand (CCL)*7 und 8 (Synonyme *monocyte chemotactic protein-2* und 3) und viele der *Insulin-like-growth-factor-binding-proteins (IGFBP)*. Neben diesen Gruppen gehören aber auch Wachstumsfaktoren (z.B. *vascular endothelial growth factor*, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) und verschiedene auf die Zellmatrix einwirkenden Faktoren, wie Matrix-Metalloproteinasen und Serinproteasen, zu den Botenstoffen des SASP.

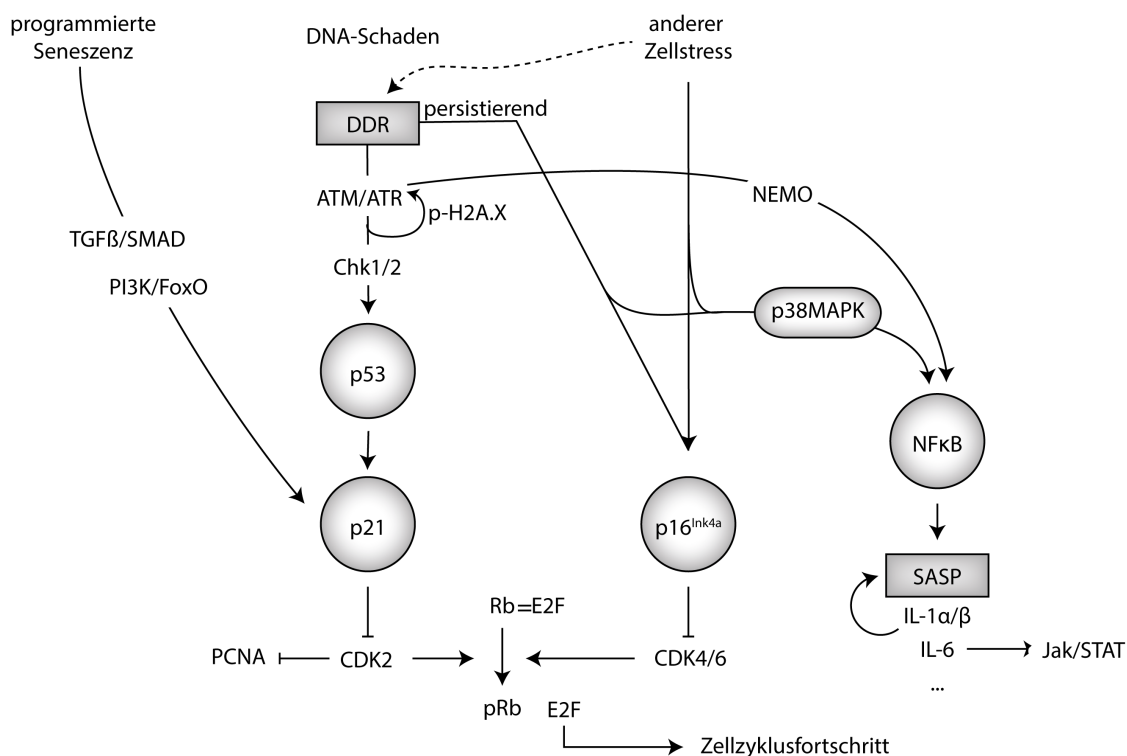


Abbildung 3: Signalwege der zellulären Seneszenz

Unvollständiger Überblick über die wichtigsten Signalwege der zellulären Seneszenz und des SASP. DNA-Schäden führen über die DDR zur Aktivierung von p21. Die programmierte Seneszenz des Embryos wird ebenfalls letztlich über p21 vermittelt. P21 inhibiert CDK2, wodurch die Phosphorylierung von Rb und die konsekutive Freisetzung von E2F verhindert wird. Dies führt zur Zellzyklusinhibition. Bei anhaltendem DDR-Signal oder verschiedenen anderen Arten von Zellstress wird durch die Induktion von p16 der dauerhafte Zellzyklusaustritt angezeigt (ebenfalls über Inhibition von CDKs und Rb). Die Aktivierung des SASP ist noch unvollständig verstanden, Schlüsselemente sind aber p38MAPK und das NFκB-System. DDR und SASP werden durch Feedback-Loops verstärkt (γ -H2A.X und IL-1). Für Details und Quellen siehe 1.2.3.

Zusammenfassend lässt sich sagen: Das Seneszenzprogramm ist in seiner Regulation komplex (siehe Abbildung 3) und in seinen Funktionen vielfältig (siehe Abbildung 2). Diese Funktionen sind situativ teilweise diametral verschieden. Zelluläre Seneszenz scheint neben seiner Funktion in der zellulären Stressantwort zudem auch eine Rolle in der Regeneration von geschädigtem Gewebe zu spielen, womit es sich an der Schnittstelle

von Stressresistenz und Regeneration, die auch das *cHccs*-KO-Modell abbildet und die hier untersucht werden soll, wiederfindet.

1.3 Das *cHccs*-Knockout-Modell und Seneszenz

1.3.1 Das *cHccs*^{+/-}-Herz zeigt Merkmale zellulärer Seneszenz

Bemerkenswerterweise weisen die HCCS-defizienten Kardiomyozyten der *cHccs*^{+/-}-Weibchen Merkmale auf, die den charakteristischen Eigenschaften seneszenten Zellen ähnlich sind (siehe Abbildung 4). So zeigen HCCS-defiziente Kardiomyozyten im Vergleich zu den „gesunden“ (sprich Cytochrom-c-positiven) Kardiomyozyten eine deutlich verminderte, wenn auch nicht komplett unterdrückte Proliferation, wie mittels Immunfluoreszenz-Untersuchungen von Zellteilungsmarkern gezeigt werden konnte⁴⁷. Ein stabiler Zellzyklusarrest und damit eingestellte Proliferation stellt das grundlegende Merkmal seneszenten Zellen dar^{4,72,127}. Zudem zeigen die KO-Zellen im *cHccs*-KO-Modell eine erstaunliche Resistenz gegenüber apoptotischen Signalen, wie *Magarin et al.* darstellen konnten¹¹⁰. Eine Resistenz gegenüber apoptotischen Signalen ist auch für seneszenten Zellen beschrieben^{113,147,181,193}.

Das *cHccs*-KO-Modell beruht, wie oben beschrieben, auf einem eingeführten Defekt der mitochondrialen Atmungskette durch gestörte Synthese von Cytochrom c und c1. Defekte der Atmungskette können zum Anstieg intrazellulärer Sauerstoffradikale (ROS) führen¹²⁵, dies gilt auch für Defekte im Komplex III der kardialen Atmungskette und den Knockout von *Hccs*¹¹⁰. So konnte auch in 13.5 dpc *cHccs*^{+/-}-Herzen gezeigt werden, dass Kompensationsmechanismen gegen erhöhte ROS-Level aktiviert wurden, beispielsweise die antioxidativen Enzyme *Superoxide dismutase 2* (SOD2) und *Thioredoxin-dependent peroxide reductase* (PRDX3). Zwar konnten ROS nicht direkt nachgewiesen werden, die Aktivierung der Kompensationsmechanismen legt aber ein vermehrtes ROS-Aufkommen mit erfolgreicher Kompensation nahe¹¹⁰.

Neben ROS im Allgemeinen, sind auch spezifische mitochondriale Defekte selbst als Auslöser von Seneszenz beschrieben^{3,36,125,134,178}: *Moiseeva et al.* beschreiben zum Beispiel die Induktion eines seneszenten Phänotyps *in vitro* nach Knockdown von RISP (*Rieske iron-sulfur protein*), das Elektronen von Ubiquinol auf Cytochrom c1 überträgt, in Fibroblasten. Auch Rotenon und Oligomycin, Inhibitoren der Atmungskette (Komplex I bzw. Komplex IV) induzieren einen seneszenten Phänotyp in Fibroblasten-Zellkultur¹²⁵. In murinen Kardiomyozyten sind in gleicher Weise Telomerschäden als Hinweis auf zelluläre Seneszenz nach Blockade der Atmungskette durch Rotenon oder durch

oxidativen Stress beschrieben³. Eine Induktion von ROS und eines seneszenten Phänotyps durch den beschriebenen Knockout im *cHccs*-KO-Modell könnte analog auch *in vivo* ablaufen.

1.3.2 Inflammation, SASP und Regeneration

Der SASP ist, wie oben dargestellt, in seinen Funktionen vielfältig und kontextabhängig. Unter anderem kann er parakrin die Regeneration von Geweben und die Hyperproliferation umliegender prämaligener oder maligner Zellen induzieren^{31,42,112,141}. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Bedingungen (*in vivo* vs. *in vitro*, embryonal vs. adult, genetischer Schaden vs. operativer Schaden, prämaligene Zellen vs. gesunde Zellen) lassen sich die bisher bekannten Mechanismen, die mittels SASP zu Regeneration und Hyperproliferation führen nicht direkt auf das *cHccs*-KO-Modell übertragen. Die bereits beschriebene Beteiligung des SASP an diesen Prozessen in anderen Zusammenhängen macht aber deutlich, wie breit das Spektrum der möglichen SASP-vermittelten Effekte ist. Insbesondere die Arbeiten von Feng et al. und Sarig et al. zeigen, dass zelluläre Seneszenz und der SASP auch an kardialer Regeneration beteiligt sein können^{55,149} (s. 1.2.2.3). Zwar wird in diesen beiden Arbeiten die Seneszenz von Fibroblasten als wesentlich angenommen, Sarig et al. zeigen aber, dass auch in Kardiomyozyten Seneszenz ausgelöst wird und die SASP-Signale der Kardiomyozyten parakrin Seneszenz in Fibroblasten induzieren und somit an den regenerativen Prozessen beteiligt sind¹⁴⁹.

Darüber hinaus gibt es weitere starke Hinweise, dass das Immunsystem und inflammatorische Mechanismen eine entscheidende Rolle bei kardialer Regeneration im neonatalen Herzen spielen. So konnten Tang et al. zeigen, dass IL-6 wesentlich für myokardiale Regeneration nach Schädigung des neonatalen Herzen ist¹⁷³. Mäuse mit IL-6-KO zeigen nach apikaler Resektion im Vergleich zur Kontrolle verminderte Regeneration und Kardiomyozyten-Proliferation. Auch Makrophagen nehmen Einfluss auf die Regeneration des neonatalen Herzens, wie Aurora et al. und Lavine et al. zeigen konnten: Ein besonderer, neonataler Subtyp von Makrophagen ist notwendiges Element der Regeneration neonataler Mauseherzen nach Myokardinfarkt⁶. Im adulten Herzen sind wiederum andere Makrophagen für ein proinflammatorisches Milieu mit verantwortlich, dass die Geweberegeneration verschlechtert¹⁰⁰.

IL-6 und mehrere Makrophagen-anziehende Chemokine sind bekannte Bestandteile des SASP. Auch vor dem Hintergrund der Arbeiten von Tang, Aurora und Lavine wäre

eine Beteiligung des SASP an der Regeneration des *cHccs*-KO-Modells also denkbar. Unterstützt wird diese Überlegung durch Voruntersuchungen, die eine Hochregulation von *Il1 β* und *Il6*-mRNA in neugeborenen *cHccs*^{+/-}-Herzen zeigen. Genomweite mRNA-Screening-Untersuchungen zeigten zudem eine Hochregulation mehrerer inflammatorischer Gene (unveröffentlichte Daten) in neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen.

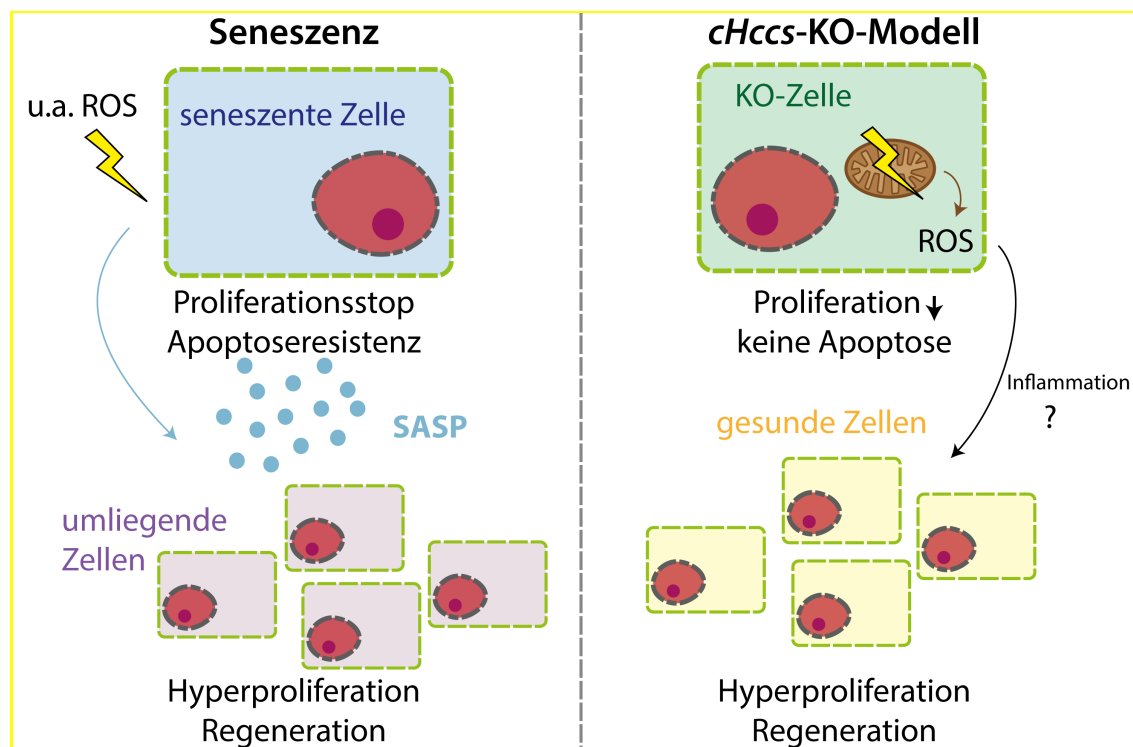


Abbildung 4: Gemeinsamkeiten zellulärer Seneszenz und des *cHccs*-KO-Modells

Seneszente Zellen und der SASP weisen Parallelen zum cHccs-KO-Modell auf. Zellstressoren (Blitz) wie u.a. auch ROS und mitochondriale Schäden sind Ursache zellulärer Seneszenz, die zum Proliferationsstopp führt und Zellen resistent gegen apoptotische Stimuli macht. Der SASP kann in bestimmten Kontexten in umliegenden Zellen Hyperproliferation und Regeneration induzieren. Im cHccs-KO-Modell liegt ein genetisch induzierter mitochondrialer Schaden (Blitz) vor, infolgedessen ROS-Kompensationsmechanismen induziert werden. Die Proliferation der Zellen ist gehemmt, es kommt aber trotz der Schädigung nicht zur Apoptose. Die gesunden Zellen der heterozygoten KO-Herzen regenerieren den Schaden durch Hyperproliferation. Zudem zeigten Voruntersuchungen Hinweise auf die Induktion inflammatorischer Signale.

1.4 Fragestellung

1.4.1 Hypothese

Basierend auf den dargestellten Überschneidungen zwischen zellulärer Seneszenz und dem *cHccs*-KO-Modell, dem SASP, Inflammation und kardialer Regeneration und der beschriebenen Voruntersuchungen soll in der hier vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob im *cHccs*^{+/-}-Herzen Nachweise eines Phänotyps zellulärer Seneszenz und des SASP gefunden werden können. Grundlegend ist folgende Hypothese (grafisch dargestellt in Abbildung 5): Der *cHccs*-KO führt in den HCCS-defizienten

Kardiomyozyten des Mausmodells zu einem seneszenten Phänotyp. Dieser trägt zum Überleben der geschädigten Zellen bei. Durch sezernierte Botenstoffe im Sinne eines SASP wird dabei auch die kompensatorische Proliferation der gesunden Zellen unterstützt oder sogar ausgelöst.

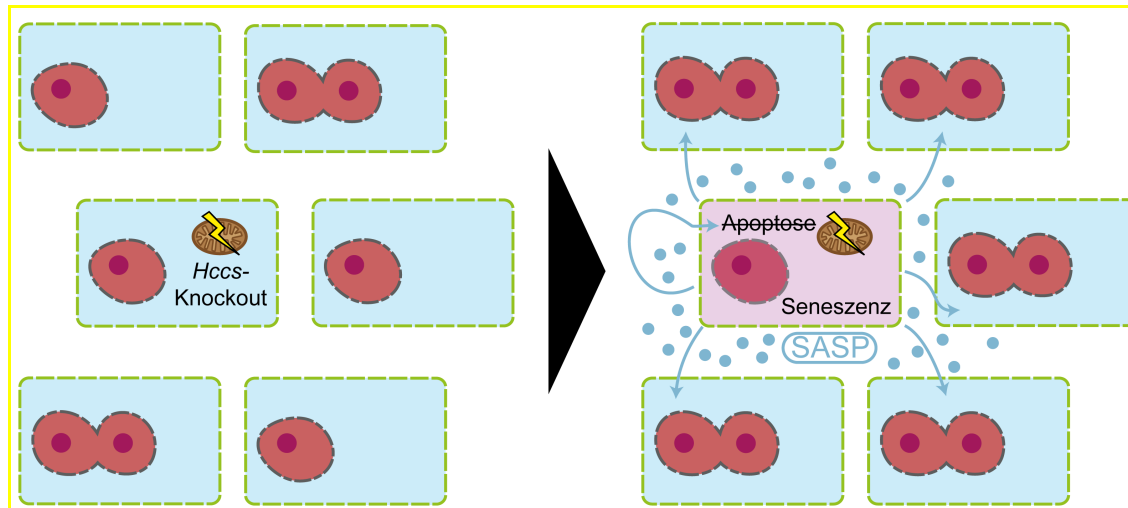


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Arbeitshypothese

Die der Arbeit zugrundeliegende Arbeitshypothese in grafischer Darstellung: Der durch den *cHccs*-KO vermittelte Defekt in der Atmungskette führt in den betroffenen Kardiomyozyten zu zellulärer Seneszenz. Diese verhindert die Apoptose der *HCCS*-defizienten Zelle und fördert über den SASP die Regeneration des Herzens durch Hyperproliferation der umliegenden gesunden Kardiomyozyten.

1.4.2 Methodik

Zelluläre Seneszenz ist, wie bereits mehrfach betont, ein sehr heterogener und von vielen Faktoren in seiner Ausprägung beeinflusster Prozess. Dies bedingt, dass auch bei einem immer fortschreitenden Verständnis keine eindeutigen Marker für zelluläre Seneszenz existieren. Dies gilt verstärkt für Prozesse *in vivo*, da viele Arbeiten in diesem Feld Zellkultur-basiert sind. Zur Charakterisierung eines eventuellen zellulären Phänotyps bedarf es immer multipler Marker, die nur in Zusammenschau eine Aussage ermöglichen^{4,72}. Dementsprechend sollen die hier untersuchten Herzen auf die Expression mehrerer etablierter Marker auf Protein- und mRNA-Ebene wie auch in der Immunhistologie untersucht werden. Besonders die histologischen Untersuchungen spielen hier aufgrund des Mosaiks von KO- und gesunden Zellen im Herzen der *cHccs*-KO-Mäuse eine wesentliche Rolle. Sie ermöglichen zum einen eine räumliche Zuordnung von Markern zu einem Zelltyp und dienen damit hier insbesondere der Unterscheidung *HCCS*-defizienter und gesunder Kardiomyozyten. Zudem können immunhistologische Untersuchungen aufgrund dieser möglichen räumlichen Zuordnung Effekte deutlich machen, die in der Analyse von Protein- oder RNA-Lösungen des gesamten Organs durch schwache Effektstärke oder sich gegenseitig aufhebende Effekte unterschiedlicher

Zelltypen nicht detektierbar sind. Dies ist im *cHccs*^{+/-}-Herzen ebenfalls aufgrund des Gewebemosaiks aus KO- und gesunden Zellen von Bedeutung.

Neben den Markern der zellulären Seneszenz sollen unterschiedlich Signalwege des SASP untersucht werden. Zentral ist dabei ein Zytokin-Antikörper-Array, das die Proteinexpression von über 100 Zytokinen überprüft und durch welches auch über den SASP hinausreichend inflammatorische Signale im *cHccs*-KO-Modell untersucht werden können.

Sowohl der *cHccs*-KO als auch zelluläre Seneszenz und insbesondere auch der SASP sind keine statischen Modelle, sondern dynamische Prozesse, die sich im zeitlichen Verlauf verändern^{47,112}. Aus diesem Grund wurden für die Untersuchungen zwei unterschiedliche Altersstufen der untersuchten Mausherzen gewählt. Zum einen wurden embryonale Mausherzen im Stadium 13.5 dpc („E13.5“) untersucht. In diesem Stadium finden bedeutende Anpassungsprozesse statt und das Verhältnis HCCS-defizienter zu gesunden Zellen beträgt noch ca. 40:60. Zum anderen erfolgten die Untersuchungen an neonatalen Mäuseherzen („P1“), die am Tag der Geburt präpariert wurden. Hier ist keine Hyperproliferation mehr nachweisbar, die Regeneration durch Proliferation also abgeschlossen⁴⁷ und genug Zeit seit Induktion des KO vergangen, um zeitlich verzögerte Effekte zellulärer Seneszenz zu untersuchen. So tritt zum Beispiel der SASP erst mit einigen Tagen Verzögerung nach Induktion von zellulärer Seneszenz auf¹¹².

1.4.3 Erhoffter Erkenntnisgewinn

Der erhoffte Erkenntnisgewinn der vorliegenden Arbeit lässt sich grob in zwei Fragen einteilen:

1.4.3.1 *Ist zelluläre Seneszenz Teil der Reaktion embryonaler und neonataler Kardiomyozyten auf mitochondrialen Stress?*

Mitochondriale Dysfunktion ist als Auslöser zellulärer Seneszenz in embryonalen und neonatalen Kardiomyozyten *in vitro* zumindest indirekt durch den Nachweis von Telomerschäden beschrieben³. Auch *in vivo* scheint zelluläre Seneszenz von Kardiomyozyten in der Embryonalentwicklung¹⁰⁹, bei der Regeneration neonataler Mausherzen nach Infarkt³⁵ und bei pathologischen Vorgängen im adulten Herzen^{158,159} eine Rolle zu spielen (s. 1.2.2.3). In dieser Arbeit soll *in vivo* das Vorkommen zellulärer Seneszenz als Reaktion auf mitochondrialen Stress im embryonalen und neonatalen Herz untersucht werden. Bezüglich Stressresistenz und Proliferationsvermögen unterscheiden sich das embryonale und neonatale Herzen deutlich vom adulten Herzen (siehe 1.1.2-

1.1.3), bei zellulärer Seneszenz handelt es sich in vielen Fällen um ein Beispiel antagonistischer Pleiotropie (s. 1.2.2.1). Dementsprechend ist vorstellbar, dass zelluläre Seneszenz von Kardiomyozyten im jungen Herzen eine positive, Regeneration und Proliferation unterstützende Wirkung hat, während es im Alter zu negativen Veränderungen führt. Um dieser These nachzugehen, soll diese Arbeit zunächst herausfinden, ob zelluläre Seneszenz in HCCS-defizienten Kardiomyozyten nachweisbar ist.

*1.4.3.2 Spielen inflammatorische Prozesse im regenerierenden Herzen des *cHccs*-KO-Modells eine Rolle?*

Zytokine haben sowohl in der Regeneration des murinen Herzens als auch in der zellulären Seneszenz als wesentlicher Teil des SASP eine große Bedeutung. Die Untersuchung wichtiger regulatorischer Signalwege und vieler unterschiedlicher Zytokine soll zunächst Aufschluss darüber geben, ob – wie Voruntersuchungen vermuten lassen – inflammatorische Signale im regenerierenden *cHccs*^{+/-}-Herzen zu finden sind. In Zusammenschluss mit den durchgeführten Untersuchungen zur zellulären Seneszenz und den regulatorischen Signalwegen kann dann eine Aussage darüber getroffen werden, ob diese Signale im Sinne eines SASP gedeutet werden können oder andere Ursachen verantwortlich sind. Auf Basis dieser Daten könnte dann in weiteren Untersuchungen die Bedeutung eventueller inflammatorischer Prozesse für das regenerative Potential des embryonalen und neonatalen Mäuserherzens anhand des *cHccs*-KO-Modells untersucht werden.

Zusammengefasst sollen die Untersuchungen dieser Arbeit die Bedeutung zellulärer Seneszenz und des SASP im *cHccs*-KO-Modell charakterisieren und damit ein besseres Verständnis der embryonalen und neonatalen Herzregeneration ermöglichen. Dies soll letztlich dazu beitragen, die Stressresistenz und das regenerative Potential junger Mäuserherzen auf das menschliche Herz übertragen zu können und die bedeutende Krankheitslast kardialer Erkrankungen zu reduzieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Axio Observer Fluoreszenzmikroskop Kamera AxioCam 503 mono Kamera AxioCam 305 color HXP 120 V Lampe N-Achroplan 10x/0,25 Ph1 M27 LD A-Plan 20x/0.35 Ph 1 Plan-Apochromat 20x/0.8 M27 N-Achroplan 40x/0,65 M27	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
Centrifuge 5418	eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5424	eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge PMC-060	Tomy Kogyo Co., Japan
Cryostat Microm Cryo Star HM 560	Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
Dampfgarer Typ 3216	De'Longhi-Braun-Household GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
E835 Netzteil für Gelelektrophorese	Consort, Turnhout, Belgien
Elektrophoresekammer	Keutz Labortechnik, Deutschland
Färbekästen TPX mit Deckel	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
FiveEasy pH-Meter F20	Mettler Toledo, Columbus, USA
Fusion Solo S Imaging System	Vilber Lourmat, Collégien, Frankreich
Gefrierschrank GSS3201/56 (-20°C)	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München, Deutschland
GeneAmp® PCR System 2700	Applied Biosystems, Waltham, USA
Glaskästen für Histologie	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, Deutschland
Glasware	IDL, Nidderau, Deutschland Schott AG, Mainz, Deutschland
HERAFreeze HFU700TV (Gefrierschrank - 80°C)	Thermo Fisher Scientific, Asheville, USA
Inkubator BD 115	Fa. Binder GmbH, Tuttlingen
Integra Pipetboy 2	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Kühl-/Gefrierkombination KGV36620/03 (Histologie)	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München, Deutschland
Kühlschrank iQ300 (Proteinanalysen)	BSH Hausgeräte GmbH, München Deutschland
Kühlschrank RIU6092AW (Lagerung Immunfluoreszenz-Schnitte)	Gorenje, Velenje, Slowenien
Magnetrührer MR Hei-Standard	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Micro Centrifuge uniCFUGE 2	LLG Labware, Meckenheim, Deutschland
Mikropistill für 1,5ml Reaktionsgefäße	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Mini PROTEAN® Tetra Cell System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Mini-Taumelmischer	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Miniplattenspinner MPS1000	Labnet International, Edison, USA
MS 3 basic Vortexer	IKA, Staufen, Deutschland
MS2 Minishaker	IKA, Staufen, Deutschland
NanoPhotometer® NP80	Implen, Westlake Village, USA
Objektträger-Strecktisch OTS 40	Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland
Objektträgerkästen nach Hellendahl	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH, Sondheim/Rhön, Deutschland

Olympus SZX7 Lichtmikroskop	Olympus, Tokio, Japan
Pioneer Feinwaage	Ohaus, Parsippany, USA
Pipetten (5000, 1000, 200, 100, 20, 10µl)	Gilson, Middleton, USA
Powerpac™ Basic	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Präzisionswaage PCB 3500-2	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
PreCellys Evolution Homogenizer	bertin Instruments, Paris, Frankreich
Rotilabo-Färbekästen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Rotilabo-Objektträgerhalter	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Severin 700 Mikrowelle	Severin, Sundern, Deutschland
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Waltham, USA
ThermoMixer C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ThermoMixer F1.5	eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermostatschrank TC 135 S	Tintometer GmbH, Dortmund, Deutschland
Thriller Thermomixer	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
uniLOOPMIX 2 Loop Rotator	LLG Labware, Meckenheim, Deutschland
Universal-Objektträger-Küvette	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Veriti 96 Well Thermal Cycler	Applied Biosystems, Waltham, USA
VMS-A Magnetrührer mit Heizplatte	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Waage SAC 62	Scaltec, Göttingen, Deutschland
Wippschüttler ROCKER 2D digital	IKA, Staufen, Deutschland
Zentrifuge Mikro 22 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Universal 320R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Deckgläser 24x50mm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Einmal-Küvetten 1,5ml	BRAND GmbH, Germany
Falcon Reaktionsröhrchen 15 + 50ml	Greiner Bio-One, Kremismünster, Austria
Precellys® 2 ml Aufschluss-Tubes	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Keramikkügelchen 1,4 mm und 2,8 mm	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Kimtech Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark® Professional, Dallas, USA
Micro-Amp® 96-Well Platten	Applied Biosystems, Waltham, USA
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Waltham, USA
Mikropistill Standard	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Parafilm® Verschlussfolie	Bemis Company, Neenah, USA
Objektträger 76x26mm	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Pipettenspitzen 1000, 200, 100, 20, 10	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 5ml	Gilson, Middleton, USA
Pipettenspitzen gestopft	nerbe plus, Winsen, Deutschland
Reaktionsröhrchen 2ml, 1,5ml, 0,5ml	eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schlauchfolie	Th. Geyer, Renningen, Deutschland
Skalpelle	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Falcon™ Stabpipetten 1ml	Thermo Scientific, Waltham, USA
Stabpipetten 25ml, 10ml	Greiner Bio-One, Kremismünster, Austria
Strips	
Superfrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
SuperFrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Vasco® Nitril Handschuhe	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Wägeschalen	Greiner Bio-One, Kremismünster, Austria
Whatman™ Filterpapier	GE Healthcare Life science

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2-Propanol (Isopropanol)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactosid (X-Gal)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aqua Spüllösung	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Citronensäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
ROTI®Mix PCR 3 (Desoxynukleosidtriphosphate dNTPs, je 10mM)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
GelRed™	Biotium, Fremont, USA
Glycerol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
IGEPAL® CA-630	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhexacyanoferrat (II) ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3 H_2O$)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhexacyanoferrat (III) ($K_3[Fe(CN)_6]$)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Luminol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
N,N-Dimethylformamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid (NaN_3)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdeoxycholat (Na-Deoxycholat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ziegenserum (<i>Normal Goat Serum</i> , NGS)	Jackson ImmunoResearch Europe, Ely, Großbritannien
p-Cumarin-Säure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Paraformaldehyd (PFA))	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure 37% (HCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
tri-Natriumcitrat Dihydrat (Na-Citrat)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethanchlorid (Tris-HCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Triton X® 100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TRIZOL® Reagenz	Invitrogen
Tween® 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid 35%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.1.4 Puffer und Lösungen

Soweit hier nicht anders genannt erfolgten Lösungen in ddH₂O.

Tabelle 4: Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Antikörper-Lösung	0,1 % (v/v) Triton® X 100, 0,05 % (v/v) Tween® 20, 1 % (w/v) BSA, (0,05% NaN ₃ (w/v)) in 1× TBS
Blocking-Lösung Immunhistologie	5 % (v/v) NGS in Antikörper-Lösung
ECL solution A	0,4 mM Cumarinsäure, 2,5 mM Luminol in 0,1M Tris-HCl pH 8,8
ECL solution B	0,018 % (v/v) H ₂ O ₂ (30 %) in 0,1M Tris-HCl pH 8,8
EDTA pH 8,0	0,5 M EDTA in ddH ₂ O, pH 8,0 mit NaOH eingestellt
Lyse-Puffer Genotypisierung	100 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,2 % (w/v) SDS in ddH ₂ O (pH 8,5), vor Lyse Zugabe von 0,02% (w/v) Proteinase K
PBS	1,8 mM KH ₂ PO ₄ in 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 140 mM NaCl, 2,9 mM KCl in ddH ₂ O (pH 7,4)
4% PFA	4 % (w/v) PFA in 1× PBS
Proteinase K	0,02 % (w/v) Proteinase K in 1× TBS
RIPA-Puffer	0,1% (w/v) SDS, 1 % (v/v) Igepal-CA630, 0,5 % (w/v) Natriumdeoxycholat, 1mM EDTA in 1× TBS
Na-Citrat-Puffer	10 mM Na-Citrat in ddH ₂ O, pH 6,0 mit HCl eingestellt
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS in ddH ₂ O
5x SDS-Probenpuffer	50 mM Tris-HCl pH 6,8, 5ml Glycerol 87% (=43,5%v/v), 3% (w/v) SDS in ddH ₂ O, 3% (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,003% (w/v) Bromphenolblau in 1x TBS
Stripping-Puffer	62,5mM Tris-HCl pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 0,7% (v/v) 2-Mercaptoethanol in 100ml ddH ₂ O
TBE	89mM Tris, 89mM Borsäure, 2mM EDTA pH 8,0 in ddH ₂ O
TBS	50 mM Tris, 150 mM NaCl in ddH ₂ O (pH 7,6)
TBS-T	0,1 % (v/v) Tween® 20 in 1× TBS
Transferpuffer	48mM Tris, 39mM Glycin, 20% (v/v) Methanol in ddH ₂ O
Tris-HCl pH 6,8/8,8	1M Tris-HCl in ddH ₂ O (pH 6,8 oder 8,8 mit HCl eingestellt)
X-Gal-Lösung	40 mg/ml X-Gal in N,N-dimethylformamid
Citronensäure/Na-Phosphat-Puffer	36,85ml 100mM Citronensäure in ddH ₂ O + 63,15ml 200mM Na ₂ HPO ₄ , pH 6,0!
X-Gal Färbelösung	40 mM Citronensäure/Na-Phosphat-Puffer, 5 mM K ₄ [Fe(CN) ₆]·3H ₂ O, 5 mM K ₃ [Fe(CN) ₆], 150 mM Natriumchlorid, 2 mM Magnesiumchlorid, 1 mg/ml X-Gal-Lösung in ddH ₂ O

2.1.5 Größenstandards

Tabelle 5: Größenstandards

Größenstandard	Hersteller
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Waltham, USA
GeneRuler 100bp DNA Ladder ready-to-use	Thermo Scientific, Waltham, USA

2.1.6 Enzyme und kommerzielle Kits

Tabelle 6: Enzyme und kommerzielle Kits

Enzym/Kit	Hersteller
DC Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
M-MuLV reverse transcriptase (200 U/μl)	New England Biolabs, Beverly, USA
Mouse XL Cytokine Array Kit (ARY028)	R&D Systems, Minneapolis, USA
SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Proteinase K (30 U/mg)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific, Waltham, USA
Taq DNA polymerase (5 U/μl)	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.7 Inhibitoren

Tabelle 7: Inhibitoren

Material	Hersteller
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Rotkreuz, Schweiz
phosSTOP™ Phosphatase Inhibitor	Roche, Rotkreuz, Schweiz
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Scientific, Waltham, USA

2.1.8 Sonstige Materialien für die Immunhistologie

Tabelle 8: Signalverstärkung und -konservierung

Kit	Hersteller
Prolong™ Gold Antifade Mountant mit DAPI	Invitrogen, Carlsbad, USA
Roti Mount	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande
TSA Plus Cyanine 3 System	Perkin Elmer, Waltham, USA

2.1.9 Primer

Alle Primer wurden lyophilisiert geliefert und in *high performance liquid chromatography*(HPLC)-Wasser gelöst. *Random hexamer primer* für die Reverse Transkription stammten von BioTez (Berlin, Deutschland). Die in den Tabellen angegebenen Konzentrationen entsprechen der Konzentration der „Arbeitslösung“, die beim Herstellen des jeweiligen Mastermixes verwendet wurde.

2.1.9.1 Genotypisierung

Tabelle 9: Primer für Genotypisierung

Zielgen	Bezeichnung	Hersteller	Sequenz (5'-3')	Größe des Amplikons	Annealing-Temperatur (°C)	Konzentration (µM)
<i>Hccs</i>	Hccs #23	eurofins, Ebersberg, Deutschland	GTT ACG GAA AGG GTG AGT GA	380 bp (<i>Hccs</i> WT Allel) 450 bp („gefloxtes“ <i>Hccs</i> Allel)	60	10
	Hccs #24		TCA TTC AGG CCA GGA CTT CT			
<i>Nkx2.5</i>	NkxCre F1		GAT GAC TCT GGT CAG AGA TAC CTG	583 bp (<i>Nkx2.5Cre</i> Knockin-Allel)		
	Nkx 2.5 R1		GCG CAC TCA CTT TAA TGG GAA GAG	Kombinationspartner für beide Forward-Primer		
	Nkx 2.5 F1		GCC CTG TCC CTC AGA TTT CAC ACC	265 bp (<i>Nkx2.5</i> WT Allel)		
<i>Sry</i>	SRY F		AGA GAT CAG CAA GCA GCT GG	249 bp (nur Männchen)		
	SRY R	TCT TGC CTG TAT GTG ATG GC				

2.1.9.2 qPCR

Tabelle 10: Primer für qPCR

Zielgen	Kodiertes Protein	Bezeichnung	Hersteller	Sequenz (5'-3')	Größe des Amplikons (bp)	Annealing-Temperatur (°C)	Konzentration (µM)
<i>Cdkn2a</i>	p16 ^{Ink4a}	mp16Ink4a_2 cDNA F	eurofins, Ebersberg, Deutschland	TTT CGG TCG TAC CCC GAT TC	107	64	2,5
		mp16Ink4a_2 cDNA R		AGA AGG TAG TGG GGT CCT CG			

<i>Ifit1</i>	IFIT-1	mIfit1_1 cDNA F		ACC CAG AGA ACA GCT ACC ACC TTT AC	261	62	5
		mIfit1_1 cDNA R		TTT CAA GCT CTG CAG GGC TTC GTC			
<i>Ifit3</i>	IFIT-3	mIfit3_2 cDNA F		GTG GAT GCT CTG AAG CAG GCC ATG	253	64	2,5
		mIfit3_2 cDNA R		GAG GAC TGT TGT TCA CTG TGG ATC GC			
<i>Cdkn1a</i>	p21 ^{Cip}	mp21-cip_2 cDNA F	BioTez, Berlin, Deutschland	CAG CTC CGG AGG ACC ACG TGG CC	150	60	5
		mp21-cip_2 cDNA R		CCA ATC TGC GCT TGG AGT GAT AG			
<i>Tp53</i>	p53	mp53 cDNA F	eurofins, Ebersberg, Deutschland	CTC ACC CTG GCT AAA GTT CTG T	271	64	5
		mp53 cDNA R		GAT CGT CCA TGC AGT GAG GT			
<i>Il1b</i>	Il-1β	mIL1β cDNA F	BioTez, Berlin, Deutschland	CCT GAA CTC AAC TGT GAA ATG CCA C	208	65	5
		mIL1β cDNA R		ACA GCT TCT CCA CAG CCA CAA TG			
<i>Polr2a</i>	RPB1	mPolr2a cDNA F	eurofins, Ebersberg, Deutschland	GAG AAG CTG GTC CTT CGA ATC	121	variabel	5
		mPolr2a cDNA R		GCA TGT TGG ACT CAA TGC ATC			

2.1.10 Antikörper

Tabelle 11: Antikörper

Milch/BSA: Trägerlösung zur Verdünnung der Antikörper. Standard/TSA: verwendetes Färbe-Protokoll (s. 2.2.6.1)

Zielprotein	Hersteller	Hersteller-ID	Spezies	Western Blot		Immunfluoreszenz	
				Verdünnung	Milch/BSA	Verdünnung	Standard/TSA
Primärantikörper							
AMPKalpha	Cell Signaling	#2532	Rabbit	1:1000	BSA		
Cytochrome c	Santa Cruz Biotechnology	sc-13156	Mouse			1:100	Standard
GAPDH	Invitrogen	MA1-16757	Mouse	1:50000	Milch		
HSP-60	Abcam	ab46798	Rabbit			1:200	Standard
IFN-g	Abcam	ab9657	Rabbit	1:2000	Milch	1:1000	TSA
IκBa	Cell Signaling	#4814	Mouse	1:1000	Milch	1:100	TSA
Jak2	Cell Signaling	#3230	Rabbit	1:1000	BSA		
NFκB	Cell Signaling	#8242	Rabbit	1:1000	BSA	1:800	Standard
p-AMPKalpha (Thr172)	Cell Signaling	#2535	Rabbit	1:1000	BSA		
p-H2A.X	Cell Signaling	#9718	Rabbit	1:1000	BSA		
p-IκBa	Cell Signaling	#2859	Rabbit	1:1000	BSA		
p-Jak2	Cell Signaling	#3776	Rabbit	1:1000	BSA		
p-MAPKAPK	Cell Signaling	#3007	Rabbit	1:1000	BSA		
p-NFκB (Ser536)	Cell Signaling	#3033	Rabbit	1:1000	BSA		
p-p38	Cell Signaling	#4511	Rabbit	1:1000	BSA		
p-Stat1	Cell Signaling	#9167	Rabbit	1:1000	BSA	1:800	TSA
p-Stat3	Cell Signaling	#9145	Rabbit	1:2000	BSA	1:200	TSA
p16	Proteintech	10883-1-AP	Rabbit	1:1000	Milch	1:500	TSA
	Abcam	ab54210	Mouse	1:500	Milch	1:500	Standard
	Cell Signaling	#4824	Rabbit	1:1000	BSA		
p21	Santa Cruz Biotechnology	sc-471	Rabbit	1:1000	Milch	1:200	Standard
p27	Santa Cruz Biotechnology	sc-528	Rabbit	1:1000	Milch	1:200	Standard
p38	Cell Signaling	#8690	Rabbit	1:1000	BSA		
p53	Santa Cruz Biotechnology	sc-6243	Rabbit	1:1000	Milch	1:200	TSA
Stat1	Cell Signaling	#9172	Rabbit	1:1000	BSA		

Stat3	Cell Signaling	#4904	Rabbit	1:2000	BSA		
Tubulin	Sigma-Aldrich	T9026	Mouse	1:5000	Milch		
Vinculin	Sigma-Aldrich	V9131	Mouse	1:5000	Milch		

Sekundärantikörper

Anti-rabbit IgG, HRP-linked	Cell Signaling	#7074	Goat	1:2000	Milch	1:500	TSA
Anti-mouse IgG, HRP-linked	Cell Signaling	#7076	Goat	1:2000	Milch	1:500	TSA
Goat anti-Mouse IgG Antibody, Alexa Fluor 488	Invitrogen	A-11001	Goat			1:500	Standard
Goat anti-Rabbit IgG Antibody, Alexa Fluor 555	Invitrogen	A21428	Goat			1:500	Standard

2.1.11 Software und Online-Tools

Tabelle 12: Software und Online-Tools

Software	Hersteller
Adobe Illustrator CS6 16.0	Adobe Systems, San José, USA
Adobe Photoshop CC 2018 19.1	Adobe Systems, San José, USA
Bio-ID advanced	Vilber Lourmat, Collégien, Frankreich
Capture Edge	Vilber Lourmat, Collégien, Frankreich
Excel 15.23	Microsoft, Redmond, USA
Primer-BLAST	U.S. National Library of Medicine, Bethesda, USA
Prism 8	Graphpad Software, San Diego, USA
StepOne v2.3	Life Technologies, Carlsbad, USA
ZEN 2.3	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Verwendete Mausstämme und Zucht

Das verwendete *cHccs*-KO-Modell wurde ausführlich von Drenckhahn und Kollegen beschrieben⁴⁷ (s. 1.1.4). Es handelt sich um einen Cre/LoxP-basierten herzkonditionalen Knockout des Enzyms HCCS, der eine Störung der mitochondrialen Atmungskette zur Folge hat. Die grundlegende Funktionsweise und Verpaarungsstrategie werden im Folgenden dargestellt.

Beim Cre/LoxP-System handelt es sich um ein System für gezielte Veränderungen von genomischen DNA-Abschnitten. Die Rekombinase Cre katalysiert die Spaltung bestimmter Basensequenzen, die als *loxP* (*locus of X-over P1*, nach dem Bakteriophagenstamm P1, aus dem das System stammt) bezeichnet werden. Ein von zwei gleichsinnig angeordneten *loxP*-Sequenzen flankierter (als *gefloxt – flanked by loxP* – bezeichneter) DNA-Abschnitt wird durch Cre entfernt, bei gegensinnig angeordneten *loxP*-Sequenzen kommt es zur Inversion des flankierten Genabschnittes¹⁵⁰.

Das Enzym Holocytochrom-c-Synthetase (HCCS) katalysiert die Aktivierung der beiden Apocytochrome c und c1 zu ihren jeweiligen Holocytochromen durch Anfügen einer Häm-Gruppe. Cytochrom c1 bildet eine Untereinheit des Komplex III der

Atmungskette und überträgt Elektronen von Quinolol auf Cytochrom c, das diese wiederum an Komplex IV der Atmungskette überträgt^{148,160}. Beide durch HCCS aktivierte Cytochrome stellen also wichtige Elemente der Atmungskette, dem Ort der oxidativen Phosphorylierung, dar. Für den herzkonditionalen Knockout des *Hccs*-Gens in der Maus wurden jeweils eine loxP-Sequenz vor und hinter der katalytischen Domäne des *Hccs*-Gens (Exon fünf bis sieben) eingebracht und somit ein „gefloxter“ Mausstamm *Hccs^{loxP/loxP}* erzeugt⁴⁷.

NK2 homeobox 5 (*Nkx2.5*) ist ein Protein aus der Gruppe der Homöobox-Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle in der Steuerung der Embryonalentwicklung spielen. *Nkx2.5* ist an der Differenzierung myokardialer Vorläuferzellen beteiligt und ab einem frühen Zeitpunkt (ca. 7.5 dpc) in allen Myokardzellen und ihren Vorläufern nachweisbar¹⁰⁶. Das für die oben genannte Rekombinase Cre kodierende Gen wurde in einer untranslatierten Region 3' des *Nkx2.5*-Gens eingefügt¹⁶³.

Die Generierung des *cHccs*-Knockouts kann exemplarisch an der Kreuzung von homozygoten geflochtenen *Hccs^{loxP/loxP}*-Weibchen und heterozygoten *Nkx2.5^{WT/Cre}*-Männchen (WT – Wildtyp) gezeigt werden. Durch die Verpaarung entstehen unter anderem Tiere, die sowohl ein gefloxtes *Hccs*-Allel als auch das veränderte *Nkx2.5Cre*-Allel besitzen. Cre wird aufgrund der Kontrolle durch den *Nkx2.5*-Promoter nur in kardialen Vorläuferzellen ab ca. Tag 7.5 dpc exprimiert. Das Enzym erkennt die loxP-Sequenzen und schneidet den geflochtenen Genabschnitt aus dem *Hccs*-Gen aus. Da die ausgeschnittenen Exons die katalytische Domäne von *Hccs* enthalten, entsteht ein Nullallel. Die betroffenen Zellen exprimieren kein funktionelles HCCS, können kein Cytochrom c und c1 synthetisieren und weisen somit eine defekte Atmungskette auf.

Nach den Vererbungsgesetzen der Geschlechtschromosomen entstehen bei der Kreuzung vier Gruppen (siehe Abbildung 6): Bei Cre-negativen (*Nkx2.5*-Wildtyp) Männchen und Weibchen liegt unabhängig vom *Hccs*-Genotyp kein herzspezifischer KO vor (*cHccs^{+/+}* bzw. *cHccs^{y/+}*). Die *cHccs^{+/+}*-Weibchen dienen bei den durchgeführten Experimenten als Kontrolle. Aufgrund der X-chromosomalen Lage des geflochtenen *Hccs*-Gens sind bei hemizygoten *cHccs*-KO-Männchen (*cHccs^{-y}*) alle Kardiomyozyten HCCS-defizient, was zum intrauterinen Fruchttod führt. Bei heterozygoten Weibchen (*cHccs^{+/-}*) führt die zufällige Inaktivierung eines X-Chromosoms zunächst zu einem Mosaik aus 50% HCCS-defizienten und 50% „gesunden“ Zellen im embryonalen Herzen, welcher wie in Kapitel 1.1.4 beschrieben im Laufe des embryonalen Wachstums durch

Hyperproliferation kompensiert wird. Diese heterozygoten Knockout-Weibchen (im Weiteren auch $cHccs^{+/-}$ abgekürzt) stellen die Experimentalgruppe dar.

Neben der hier geschilderten Kreuzung sind auch andere Kombinationen des elterlichen Genotyps denkbar, auf deren Darstellung aus Gründen der Übersichtlichkeit hier verzichtet werden soll. Wesentlich ist die Kombination aus Cre-positiven und heterozygot geflochten $Hccs$ -Allelen in weiblichen Nachkommen, die die Experimentalgruppe ausmachen, sowie weiblichen Nachkommen, die entweder kein Cre oder kein geflochtenes $Hccs$ -Allel aufweisen und als Kontrolle dienen (siehe auch 2.2.3.4).

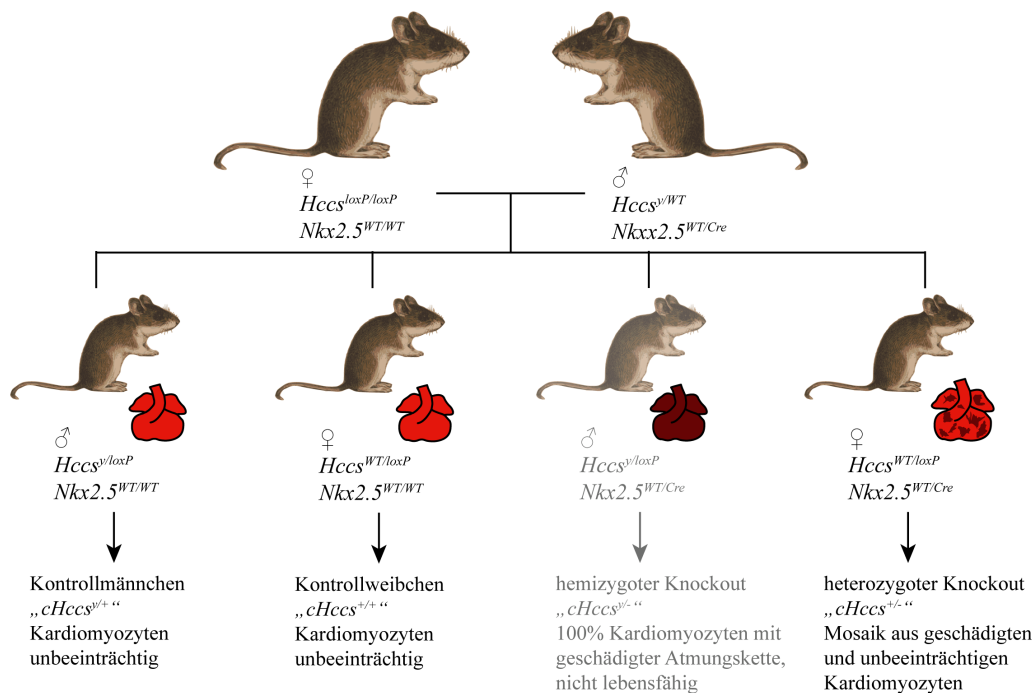


Abbildung 6: Kreuzschema zur Generierung des herzkonditionalen $Hccs$ -Knockouts

Die Kombination eines geflochten $Hccs$ -Allels mit der herzkonditionalen Expression der Cre -Rekombinase in $Nkx2.5^{WT/Cre}$ -Mäusen erzeugt heterozygote Knockout-Weibchen, deren Kardiomyozyten ein Mosaik aus unbeeinträchtigten Zellen und Zellen mit $HCCS$ -Defizienz und damit einer gestörten Atmungskette aufweisen. Für den Knockout hemizygoter Männchen versterben intrauterin, Cre -negative Tiere sind gesund, $cHccs^{+/+}$ -Weibchen dienen in den Experimenten als Kontrolle. Abbildung adaptiert nach Hennig⁷¹

2.2.2 Tier- und Organpräparation

Alle Tierversuche wurden unter Einhaltung der Verordnung zum Schutz von Versuchstieren des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und waren durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (Aktenzeichen T0113/07) bzw. das Regierungspräsidium Gießen genehmigt (Tierversuchsantrag V 54 – 19 c 20 15 h 01 GI 20/12 Nr. 49/2017). Die beteiligten Mitarbeiter waren geschult und zu ihren Tätigkeiten durch zuvor genannte Tierversuchsgenehmigungen befugt. Die Präparation der Tiere und Organe erfolgte wie bei Hennig beschrieben⁷¹, fünf Tage alte Mäuse und ihre Herzen wurden entsprechend neonataler Mäuse und Herzen präpariert.

2.2.2.1 Vermeidung von Wurfefekten

Ein Wurf kann durch Umwelteinflüsse während der Trächtigkeit oder bestimmte (epi)genetische Faktoren der Elterntiere beeinflusst sein. Bei Verwendung von Tieren eines Wurfs innerhalb einer Versuchsgruppe (Kontroll- oder *cHccs*^{+/-}-Gruppe) können sich diese elterlichen Einflüsse bei biochemischen oder histologischen Analysen als vermeintliche Gruppenunterschiede darstellen und fälschlicherweise auf die zu untersuchende Variable zurückgeführt werden. Um diesen sogenannten Gruppeneffekt vorzubeugen, wurden für die durchgeführten Experimente soweit möglich Tiere aus verschiedenen Würfen innerhalb der *cHccs*^{+/-}- und der Kontroll-Gruppe gemischt.

2.2.3 Genotypisierung

Um die Proben der *cHccs*^{+/+}- bzw. *cHccs*^{+/-}-Gruppe entsprechend zuzuordnen und die Eltern korrekt verpaaren zu können (Zuchtplanung) mussten sowohl das Geschlecht bestimmt als auch das *Nkx2.5*- und das *Hccs*-Gen auf *Cre* bzw. *LoxP*-Sites überprüft werden. Dies geschah durch DNA-Isolation, Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) und Agarosegelelektrophorese.

2.2.3.1 Isolation von DNA aus kardialem Gewebe

Die Isolation der genomischen DNA (gDNA) erfolgte aus der abgetrennten Schwanzspitze (P1 und P5) bzw. einer Ohrstanze (P21 und adulte Elterntiere). Je nach Größe des Gewebestücks wurden 200-500µl Lyse-Puffer mit Proteinase K (s. Tabelle 4) hinzugegeben. Das Gewebe wurde über Nacht bei 55°C und 700 rpm im Thermoschüttler durch die Proteinase K verdaut. Das Lysat wurde am nächsten Tag 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) mit 14000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert um unverdaute Bestandteile wie Haare zu pelletieren. 150µl Überstand wurden abgenommen und mit 150µl Isopropanol vermischt. Zur Fällung der DNA wurde die Lösung dann für mindestens 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 15 Minuten mit 14000rpm bei RT wurde der Überstand verworfen. Das verbliebene DNA-Pellet wurde mit 300µl 70% Ethanol gewaschen und dann bei RT und 14000rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett verworfen und das verbliebene DNA-Pellet im Heizblock bei 37°C für ca. 20 Minuten getrocknet. Bei 50°C und 700 rpm wurde dann die DNA im Thermoschüttler in 30µl doppelt destilliertem H₂O (ddH₂O) gelöst. Die Konzentration der gDNA wurde photometrisch bei 260 nm mit ddH₂O als Leerprobe gemessen und für die folgende PCR auf 100ng/µl mit ddH₂O verdünnt.

2.2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR dient der Analyse von Ribo- und Desoxyribonukleinsäuren (RNA bzw. DNA). Das Verfahren beruht auf der Vervielfältigung eines kurzen und spezifischen Genabschnitts mittels zyklisch wiederholter DNA-Synthese. Die Wasserstoffbrücken der doppelsträngigen genomischen DNA (gDNA) werden zunächst durch einen Denaturierungsschritt aufgetrennt. An die nun einsträngige gDNA können im zweiten Schritt synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die sogenannten Primer, binden (*Annealing*, dt. „ausheilen“). Diese sind zu gegensinnigen Sequenzen des Zielgens komplementär und werden entsprechend ihrer Orientierung als vorwärts bzw. *forward* und rückwärts bzw. *reverse* Primer bezeichnet. Die Primer bilden den Startpunkt der Synthese eines komplementären DNA(cDNA)-Strangs durch die hitzestabile Taq-Polymerase (Elongation). Durch die zyklische Wiederholung dieser drei Schritte (Denaturierung, Annealing, Elongation) und die Gegensinnigkeit der Primer wird letztendlich der zwischen den Primern befindliche Genabschnitt, das Amplikon, exponentiell vervielfältigt. Dadurch kann dieser in weiteren Analyseverfahren nachgewiesen werden.

Tabelle 13: PCR-Ansatz und -Zyklus

Reaktionsansatz		PCR-Zyklus			
Komponente	Volumen	Schritt	Temp.	Dauer	Wiederholung
ddH ₂ O	19,4 µl	Initiale Denaturierung	95°C	3 min	1x
10x CoralLoad PCR-Puffer	2,5 µl	Denaturierung	95°C	30 s	40x
dNTPs (2,5mM)	1,0 µl	Annealing	60° C	45 s	
Forward Primer (10µM)	0,5 µl	Elongation	72°C	60 s	
Reverse Primer (10µM)	0,5 µl	Elongation	72°C	8 min	1x
taq-Polymerase (5U/µl)	0,1 µl	Kühlung	4°C		∞
Template gDNA (100ng/µl)	1 µl				
Gesamt-Reaktionsvolumen	25µl				

Die genaue Zusammensetzung eines einzelnen PCR-Ansatzes und die einzelnen Schritte des PCR-Zyklus (durchgeführt im Veriti™ 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems) finden sich in Tabelle 13. Nach durchlaufener PCR wurde das Produkt direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C eingefroren.

2.2.3.3 Agarosegelelektrophorese

In der Agarosegelelektrophorese können die PCR-Produkte nach Größe aufgetrennt und sichtbar gemacht werden. Agarose wurde durch Erhitzen in der Mikrowelle in TBE-Puffer gelöst (2% w/v) und in eine Gelkammer gegossen. In das noch flüssige Gel wurde ein Kamm eingesetzt. Nach Abkühlen des Gels und Herauslösen des Kamms wurden 8µl

des jeweiligen PCR-Ansatzes und ein kommerzieller Größenstandard (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, Thermo Scientific) in die Taschen gegeben. Dann wurde für 2-2,5h eine Spannung von 100V angelegt. Als Lauf-Puffer in der Gelwanne diente ebenfalls TBE. Der CoralLoad-PCR-Puffer (Qiagen) im PCR-Produkt diente als Ladepuffer. Durch die negative Ladung der Nukleinsäuren wandern diese zur Anode und werden im Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt. Nach Beendigung des Gellaufes wurde das Gel für 20 Minuten in GelRed™ (Biotium) gelegt, das mit doppelsträngiger DNA interkaliert. Nach einem kurzen Waschschrift in Wasser zur Vermeidung von Hintergrundleuchten konnte die mit dem DNA-Farbstoff GelRed™ interkalierte DNA und damit die PCR-Produkte durch UV-Strahlung im Imager (Fusion Solo S Imaging System, Vilber Lourmat) sichtbar gemacht und fotografiert werden.

2.2.3.4 Interpretation

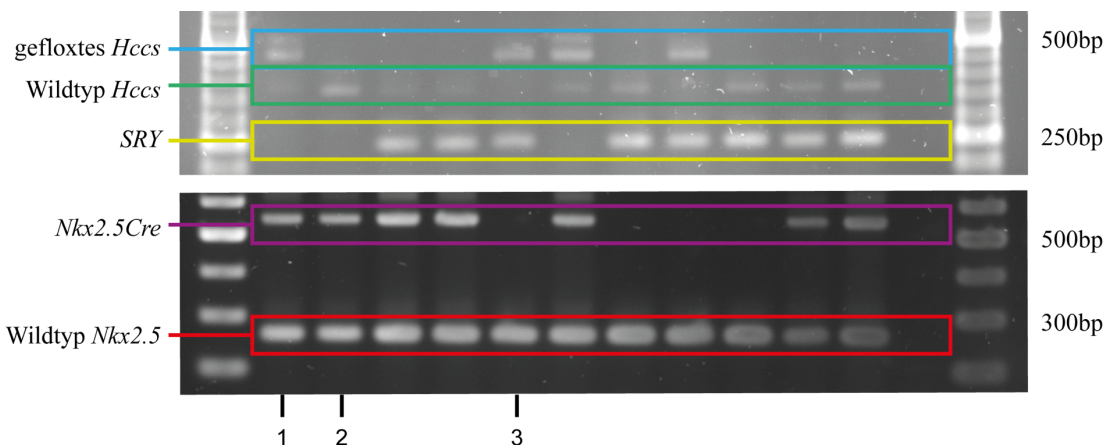


Abbildung 7: Beispiel-Agarosegel zur Genotypisierung

Beispielhafte Bilder der Genotypisierung von P1-Mäusen, oben *Hccs* (WT und gefloxt) und *SRY*, unten *Nkx2.5* (*Cre* und WT). Beispielhafte Interpretation für die am unteren Rand markierten Proben:

1. Wildtyp (schwache Bande) und gefloxtes *Hccs*-Allel, kein *SRY*-Produkt, ein *Nkx2.5Cre*-Allel und ein *Nkx2.5*-WT-Allel > weibliches Tier, dessen gefloxtes *Hccs*-Allel durch *Cre* im Herzen ausgeschnitten wird: $cHccs^{+/-}$
2. Wildtyp, aber kein gefloxtes *Hccs*-Allel, kein *SRY*-Produkt, ein *Nkx2.5Cre*-Allel und ein *Nkx2.5*-WT-Allel > weibliches Tier; kein *Cre*-Effekt, da kein gefloxtes *Hccs*-Allel: $cHccs^{+/+}$
3. Wildtyp und gefloxtes *Hccs*-Allel, *SRY*-Produkt vorhanden, *Nkx2.5*-WT-Allel, aber kein *Nkx2.5Cre*-Allel > männliches Tier; das gefloxtes *Hccs*-Allel wird bei fehlendem *Cre* nicht ausgeschnitten: $cHccs^{y/+}$

Zur Genotypisierung kamen spezifische Primerpaare für das *sex determining region of Y* (*SRY*)-Gen, Wildtyp- und gefloxtes *Hccs*-Allel sowie *Nkx2.5*-WT und *Nkx2.5Cre*-Allel zum Einsatz. Bei Vorhandensein des *SRY*-Gens kann von männlichem Geschlecht ausgegangen werden. Aufgrund der unterschiedlichen Produktgrößen von WT und gefloxtem *Hccs*-Allel sowie *Nkx2.5*-WT und *Nkx2.5Cre*-Allel (siehe 2.1.9) kann durch das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit der entsprechenden Bande im Agarosegel der Genotyp und das Geschlecht der Mäuse bestimmt werden (s. Abbildung 7).

2.2.4 RNA-Expressionsanalyse

Die Regulation von Signalwegen und anderen zellulären Mechanismen geschieht unter anderem auf Ebene der Transkription durch Induktion oder Repression entsprechender Gene. Dies kann durch Bestimmung der vorhandenen mRNA-Menge dieser Gentranskripte untersucht werden. Zu diesem Zweck wird aus Probenmaterial isolierte RNA zu komplementärer DNA umgeschrieben und in der quantitativen Real-time-PCR quantifiziert.

2.2.4.1 Reverse Transkription der RNA zu cDNA

Bei der reversen Transkription (rT) wird die zuvor im Rahmen anderer Projekte isolierte RNA (Vorgehensweise bei der Isolation siehe Hennig⁷¹) mit Hilfe einer reversen Transkriptase zu komplementärer Einzelstrang-DNA (*complementary DNA, cDNA*) umgeschrieben. Als Ansatz für die Transkriptase dienen synthetische Primer mit einer zufällig generierten Sequenz aus sechs Nukleotiden (*random hexamer Primer*), die an multiple Sequenzen der RNA-Vorlage anlagern und somit ein vollständiges Umschreiben des gesamten RNA-Stranges ermöglichen. Für die reverse Transkription wurde das *Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV)*-Kit (New England Biolabs®) verwendet. Zunächst wurde 1µg RNA mit nukleasefreiem Wasser (HPLC-Wasser) auf 10µl Volumen verdünnt und mit *random hexamer Primern* und Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP, ROTI®Mix PCR 3, Carl Roth) für fünf Minuten auf 70°C erwärmt, um Sekundärstrukturen zu lösen. Danach wurden der 10x-rT-Puffer, die Transkriptase und zusätzlich ein RNase-Inhibitor (RiboLock RNase Inhibitor, Thermo Scientific, Waltham, USA), der den Abbau von RNA durch eventuell verunreinigende RNAsen verhindert, hinzugegeben. Dieser Ansatz (gesamtes Reaktionsvolumen 20µl) wurde für zehn Minuten bei 25°C (Primer-Anlagerung), eine Stunde bei 42°C (DNA-Synthese) und 20 Minuten bei 65°C (Enzymdeaktivierung und Denaturierung) inkubiert. Die so transkribierte cDNA wurde mit HPLC-Wasser 1:5 verdünnt und danach bei -20°C gelagert. Die genaue Zusammensetzung des Ansatzes findet sich in Tabelle 14.

Tabelle 14: Reaktionsansatz reverse Transkription

Denaturierung		RT-Reaktion	
dNTPs (2,5mM)	4,0 μ l	Ansatz aus Denaturierung	16 μ l
random hex. Pr. (50 μ M)	2 μ l	10x M-MuLV rT-Puffer (NEB)	2 μ l
RNA 1 μ g ad HPLC-H ₂ O	10 μ l	RNase Inhibitor (20 U/ μ l)	1 μ l
		M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/ μ l)	1 μ

2.2.4.2 Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (*quantitative real time PCR, qPCR*) kombiniert die unter 2.2.3.2 erläuterte PCR mit einer Quantifizierung der DNA-Amplifikation durch Fluoreszenzmessung nach jedem PCR-Zyklus. Möglich wird das durch die Verwendung des beigefügten Fluorochroms SYBR-Green. SYBR-Green bindet an doppelsträngige DNA und emittiert im gebundenen Zustand bei Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (Maximum bei 494nm) grünes Licht (Wellenlänge 521nm)¹⁶⁹. Die emittierte Lichtintensität korreliert dadurch mit der Menge der im Reaktionsvolumen vorhandenen DNA. Durch die exponentielle Vervielfältigung der cDNA nimmt auch die nach jedem Elongationsschritt gemessene Lichtintensität exponentiell zu. Dies ermöglicht die relative Quantifizierung der Expression des durch das Primerpaar festgelegten Gens (Zielgen) durch Normalisierung auf ein ubiquitär exprimiertes Referenzgen (den sogenannten *Housekeeper*). Dazu wird zunächst der PCR-Zyklus bestimmt, in dem die gemessene Lichtintensität einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Dieser Zyklus wird als *cycle of threshold* (C_T) bezeichnet. Je höher die Menge an cDNA des Zielgens bzw. *Housekeeper*-Gens im PCR-Ansatz und dementsprechend die Menge an mRNA des Zielgens im Gewebe, desto früher wird der Schwellenwert erreicht und desto niedriger der C_T -Wert.

Quantifizierung mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode

Zur Quantifizierung werden für jede Probe die C_T -Werte des Zielgens auf den *Housekeeper* normalisiert und dann Kontroll- und *cHccs*^{+/-}-Gruppe verglichen, wie im Folgenden erläutert:

Da im Idealfall pro Zyklus die eingesetzte DNA N_0 verdoppelt wird, gilt für die DNA-Menge N in Abhängigkeit vom PCR-Zyklus C folgende Gleichung:

$$N = N_0 * 2^C$$

Zunächst wird das Zielgen auf den *Housekeeper* normalisiert, dabei ergibt sich der normalisierte Wert X :

$$X = \frac{N_{0 \text{ Zielgen}}}{N_{0 \text{ Housekeeper}}}$$

Durch Einsetzen der obigen Formel, Umformen und Kürzen der Gleichung (detaillierte Darstellung bei Livak und Schmittgen¹⁰⁷) ergibt sich dabei als normalisierter Wert X:

$$X = 2^{\Delta C_T} \text{ mit } \Delta C_T = (C_{T \text{ Zielgen}} - C_{T \text{ Housekeeper}})$$

Zur Ermittlung der relativen Veränderung der Expression („fold change“, fc) des Zielgens in $cHccs^{+/-}$ -Herzen im Vergleich zu Kontrollherzen wird der normalisierte Wert der einzelnen Proben (Kontroll- und $cHccs^{+/-}$ -Herzen) durch den Mittelwert der normalisierten Werte der Kontrollgruppe geteilt. Durch Umformen ergibt sich dann wiederum (detaillierte Darstellung bei Livak und Schmittgen¹⁰⁷):

$$fc = 2^{\Delta \Delta C_T} \text{ mit } \Delta \Delta C_T = \Delta C_{T \text{ Probe}} - \Delta C_{T \text{ Mittelwert aller Proben der Kontrollgruppe}}$$

Durch Kenntnis der jeweiligen C_T -Werte kann also die relative Genexpression des Zielgens in jeder Probe bestimmt werden. Ein $fc > 1$ entspricht einer vermehrten Transkription eines Zielgens, ein $fc < 1$ entsprechend einer verminderten Transkription. Anhand dieser Werte können dann in einem letzten Schritt die beiden Gruppen statistisch miteinander verglichen werden.

Protokoll

Es wurde der kommerzielle SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) verwendet, der bereits Polymerase, dNTPs, PCR-Puffer und SYBR-Green beinhaltet, sodass nur noch genspezifische Primer und Template cDNA zugegeben werden mussten. Annealing und Elongation finden im Rahmen des verwendeten PCR-Programms parallel bei der primerspezifischen Annealingtemperatur (s. 2.1.9) statt. Genauer qPCR-Ansatz und Zyklus finden sich in Tabelle 15. Für jedes Tier wurden zur Reduktion von technischen Ungenauigkeiten drei Ansätze auf eine 96-Well-Platte aufgetragen und deren C_T -Werte gemittelt. Einzelne Ausreißer innerhalb dieser Triplets, die $>1 C_T$ Abweichung zeigten, wurden nicht in die Analyse mit einbezogen.

Folgende Schritte dienten der parallelen Qualitätskontrolle jedes qPCR-Experiments (zur Erläuterung siehe 0): Zur Effizienzkontrolle der Primer wurde zusätzlich zu den zu untersuchenden Proben für jedes Primerpaar eine fünffache Verdünnungsreihe mit stufenweise halbierten cDNA-Mengen eines neonatalen $cHccs^{+/-}$ -Herzens (unverdünnt, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16) als Template mit pipettiert. Als Negativ-Kontrolle wurde statt cDNA-Template HPLC-H₂O verwendet (sogenannte *no template control*, NTC). Nach dem qPCR-Lauf wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Die Durchführung und Auswertung der qPCR-Läufe fand im StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) und der dazugehörigen StepOne Software statt.

Der Schwellenwert des C_T wurde automatisch durch die Software errechnet und nur in Ausnahmefällen zur Optimierung manuell korrigiert.

Tabelle 15: Reaktionsansatz und -zyklus der qPCR

Ansatz		Zyklus			
Komponente	Volumen	Schritt	Zeit	Temperatur	Wdh.
HPLC-H ₂ O	6,2 µl	Initiale Denaturierung	30 s	95	1x
<i>Forward Primer</i>	1,4 µl	Denaturierung	10 s	95	40x
<i>Reverse Primer</i>	1,4 µl	Annealing + Elongation	60 s	Primerspezifisch	
SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix	10 µl	Schmelzkurve (programmiert)			1x
cDNA bzw. HPLC-H ₂ O	1 µl				

Primerdesign und -optimierung

Nicht bereits in der Arbeitsgruppe etablierte Primersequenzen wurden mit dem NCBI Online Tool *Primer Blast* design¹⁹². Die zum Design verwendeten Vorgaben sahen unter anderem vor, dass die beiden Primer ein Intron einschließen. Damit wird verhindert, dass auch nicht gespleißte prä-mRNA oder gDNA amplifiziert wird, da aufgrund des Introns das Amplikon so viele Basenpaare (bp) enthalten würde, dass die Elongationsdauer nicht zur vollständigen Synthese des DNA-Abschnitts ausreicht. Das Amplikon sollte im Bereich von 100-250 bp liegen, da der PCR-Zyklus auf eine solche Größe optimiert ist. Zudem wurde eine Schmelztemperatur von 60°C und ein GC-Gehalt von mindestens 50% angestrebt.

Die $\Delta\Delta C_T$ -Methode setzt voraus, dass die PCR-Effizienz der beiden zur Berechnung verwendeten Primerpaare (Zielgen und Housekeeper) annähernd gleich und annähernd bei 100% liegt¹⁰⁷. Die mit *Primer Blast* designten Primerpaare wurden deswegen auf eine Effizienz von 90-110% überprüft. Dazu wurde bei neuen, noch nicht etablierten Primerpaaren zunächst eine PCR mit sechs verschiedenen Annealingtemperaturen (58 - 59,5 - 61 - 62,5 - 64 - 65,5 °C) durchgeführt. In der Regel wurde dies mit einem *cHccs^{+/-}*-Herz-cDNA-Template durchgeführt, bei schwacher Expression im Herzen wurde auch auf cDNA anderer Gewebe zurückgegriffen. Im Agarosegel konnten die Temperaturen dann anhand der Bandenintensität und eventuell auftretender, unerwünschter unspezifischer Banden verglichen werden. Eine positive NTC – also das Auftreten einer Bande in der Negativkontrolle mit Wasser als Template – führte zum Ausschluss des Primerpaars. Mit der Annealingtemperatur, deren Produkt ein möglichst starkes und spezifisches Bandensignal im Agarosegel zeigte, wurde dann eine qPCR nach obigem

Schema mit unterschiedlichen Primerkonzentrationen (in der Regel 1, 5 und 10µM Konzentration der Arbeitslösung) mit einer 5-fachen 1:2-Verdünnungsreihe (unverdünnt, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16) in Zweifachkontrolle durchgeführt. Mithilfe der Verdünnungsreihe konnte die Effizienz des Primerpaares in der qPCR-Software (StepOne, Applied Biosystems) überprüft werden (Grenzwerte 90-110%, Korrelationskoeffizient >0,9). Mittels einer Schmelzkurvenanalyse konnte in der Software auch die Spezifität des Primerpaares überprüft werden: Bei einem spezifischen PCR-Produkt zeigt sich bei steigender Temperatur der Probe nur ein einzelner Signalgipfel, der durch Dissoziation des Doppelstrangs entsteht. Mehrere Signalgipfel oder ein fehlender spezifischer Gipfel führten zum Ausschluss eines Primerpaares.

2.2.5 Proteinanalysen

2.2.5.1 *Isolation von Proteinen aus kardialem Gewebe*

Durch Analyse von Proteinen im Western Blot können vergleichende Aussagen über die Menge von Proteinen oder auch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung zwischen zwei Versuchsgruppen getroffen werden. Dazu müssen in einem ersten Schritt die Proteine aus dem präparierten kardialen Gewebe isoliert werden.

Bei E13.5-Herzen wurde zu dem präparierten Organ 80µl *radioimmunoprecipitation assay buffer* (RIPA)-Puffer, der zuvor mit Phosphatase- und Protease-Inhibitoren versetzt wurde, gegeben. Mit Einwegpistillen wurde das Gewebe in einem Reaktionsgefäß manuell zu einer homogenen Suspension zerkleinert.

P1-Herzen wurden wiederum in ein 2ml-Röhrchen (VWR International) transferiert, in dem sich Keramikkügelchen unterschiedlicher Größe befanden. Es wurden 300µl RIPA-Puffer (wiederum mit Phosphatase- und Protease-Inhibitor versetzt) hinzugegeben. Nun wurde im Homogenisator (*PreCellys Evolution, Bertin Instruments*) zweimal bei 5500 rpm für 20s mit einer Pause von 30s homogenisiert. Nach Abzentrifugieren der Keramikkügelchen wurde das Lysat in ein Reaktionsgefäß überführt.

Die Proteinlysate der embryonalen und neonatalen Herzen wurden dann 90 Minuten im Schüttler bei 4°C homogenisiert, dann bei 14000 rpm fünf Minuten zentrifugiert, um Gewebereste zu pelletieren. Der die Proteine enthaltende Überstand wurde abpipettiert und bei -80°C gelagert.

2.2.5.2 *Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry*

Die Bestimmung der Proteinkonzentration geschah photometrisch durch das *DC Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories). Die einzelnen Schritte erfolgten laut

Herstellerprotokoll, die Proteinlysate wurden vor Messung 1:5 mit Wasser verdünnt. Die Konzentrationsmessung des Assays beruht auf einer Blaufärbung der Proben. Da sich die Extinktion bei 750nm (gemessen im NanoPhotometer® NP80, Implen) proportional zur Proteinkonzentration verhält, kann durch eine Eichgerade die Proteinkonzentration in der Probe bestimmt werden. Die Eichgerade wurde durch Messung der Extinktion von Proben mit bekannter Konzentration (0; 0,16; 0,32; 0,8; 1,0; 1,2 und 1,5 mg/ml in H₂O) bovinen Serumalbumins (BSA) ermittelt. Von den Extinktionen der Proteinlysate wurde zudem die Extinktion einer 1:5 verdünnten RIPA-Probe abgezogen, um den Einfluss des Puffers zu eliminieren. Anhand der Extinktionswerte der einzelnen Proben konnte deren Proteinkonzentration über die Geradengleichung der Eichgerade in Microsoft Excel errechnet werden.

2.2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Mittels der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) können Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Durch das negativ geladene Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfat*, SDS) werden die Proteine denaturiert und einheitlich negativ geladen. Dies führt im elektrischen Feld unabhängig von der Eigenladung der Proteine zur Wanderung Richtung Anode und aufgrund der unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit im Gel zu einer Auftrennung nach Größe. Die Porengröße und damit die Laufgeschwindigkeit und Auftrennungskapazität des Gels ist abhängig von der Acrylamidkonzentration (höher > kleinere Poren > niedrigere Laufgeschwindigkeit). Zunächst wird ein vierprozentiges Sammelgel durchlaufen, in dem sich die Proteine ausrichten und „vorsortieren“. Je nach Größe der zu analysierenden Proteine wird dann ein 12- oder 15-prozentiges „Trenngel“ zur eigentlichen Größenauftrennung verwendet. Durch Zugabe von Bromphenolblau im Ladepuffer kann die Lauffront beobachtet werden, zur Größenbestimmung der später zu detektierenden Proteinbanden dient ein kommerzieller Größenstandard (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, Thermo Scientific), der vorgefärbte Proteine bestimmter Größe enthält.

Protokoll

Die Gele wurden entsprechend Tabelle 16 mit Hilfe des Mini PROTEAN® Tetra Handcast System (Bio-Rad Laboratories) gegossen. Nach dem Eingießen des Trenngels wurde dies mit Isopropanol überschichtet. Dies führt zu einer glatten Oberfläche und verhindert den Kontakt mit Sauerstoff, der die Polymerisation stören würde. Nach Auspolymerisation und Entfernen des Isopropanols wurde das frisch angesetzte

Sammelgel aufgegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach erneuter Auspolymerisation des Sammelgels konnten die Gele in mit Tris-HCl (pH 8,8) getränkten Tüchern eingeschlagen und luftdicht verpackt bis zu zwei Wochen im Kühlschrank gelagert werden.

Je nach verfügbarer Menge wurden 20µg-40µg Protein mit der entsprechenden Menge 5x SDS-Probenpuffer versehen. Die mit Probenpuffer versehene Probe wurde für fünf bis zehn Minuten bei 95°C denaturiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen. Die Probe wurde dann entweder sofort in die Taschen des Gels pipettiert oder bei -20°C (Tage) bzw. -80°C (längerer Zeitraum) zwischengelagert. Der Gellauf wurde im Mini PROTEAN® Tetra Cell System (Bio-Rad Laboratories) in 1x SDS-Laufpuffer durchgeführt. Nach Pipettieren der Proben und des Größenstandards in die Geltaschen wurde zunächst das Sammelgel bei einer Spannung von 50 V durchlaufen, danach bei einer Spannung von 80-100 V das Trenngel bis zur gewünschten Auftrennung.

Tabelle 16: Zusammensetzung Gele Westernblot

	H ₂ O	Acrylamid 30%	1M Tris-HCl (pH 8,8)	1M Tris-HCl (pH 6,8)	10% SDS	10% APS	TEMED
Trenngel (12%)	3,14ml	6ml	5,63ml	-	150µl	75µl	15µl
Sammelgel (4%)	7,26ml	1,33ml	-	1,25ml	100µl	50µl	10µl

2.2.5.4 Western-Blot (Semidry-Verfahren)

Zur Detektion müssen die im Gel aufgetrennten Proteinbanden auf eine Membran übertragen werden. Dies geschieht durch Anlegen eines elektrischen Feldes, in dem die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulose(NC)-Membran wandern und dort binden. Um ein Austrocknen durch die Wärme des elektrischen Feldes zu verhindern, sind Gel und Membran in einem „Sandwich“ aus in Transferpuffer getränkten Filterpapieren geschützt (halb-trocken – „*semidry*“):

Die Polyacrylamidgele mit den Proteinbanden wurden für zehn Minuten in Transferpuffer geschwenkt, ebenso die NC-Membran und sechs Whatman™-Filterpapiere (GE Healthcare Life Science). Zwischen jeweils drei Filterpapieren wurden Membran und Gel in eine Schublade des Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad Laboratories) gelegt, die Membran auf Seite der Anode. Etwaige Luftblasen wurden ausgestrichen und die Schublade geschlossen. Es wurden für 30 Minuten 25 V Spannung angelegt.

2.2.5.5 Proteindetektion

Um die Proteinbanden auf der NC-Membran sichtbar zu machen, werden Antikörper verwendet, die spezifisch an ihrem Antigen auf der Membran binden. An diese sogenannten Primärantikörper binden in einem zweiten Schritt wiederum Antikörper gegen Epitope der Primärantikörper (Sekundärantikörper). Die Sekundärantikörper sind

mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase* – HRP) gekoppelt. Dieses katalysiert die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid. Bei der Reaktion wird Licht emittiert [sogenannte *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Reaktion], was durch Film oder Kamerasensoren detektiert und aufgenommen werden kann. Die emittierte Lichtintensität ist proportional zu der Menge gebundener HRP und damit indirekt zu der Menge des auf der Membran gebundenen Zielproteins. Durch Abgleich mit den sichtbaren Markerbanden des Größenstandards kann auf die ungefähre Größe des Zielproteins geschlossen werden.

Protokoll

Zum Blocken unspezifischer Proteinbindungsstellen wurden die NC-Membranen nach dem erfolgten Blot für eine Stunde in fünfprozentiger Trockenmilchlösung (Lösungsmittel TBS-T) auf dem Schüttler geblockt. Danach wurden die Membranen gegebenenfalls horizontal, also parallel zur Lauffront, in mehrere Teile geschnitten, was simultan die gezielte Detektion verschieden großer Proteine eines Gellaufs ermöglicht. Die Membranabschnitte wurden über Nacht mit dem entsprechend verdünnten Primär-Antikörper des Zielproteins in Plastikfolien eingeschweißt und bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für fünf Minuten in TBS-T wurden die Membranen für ein bis zwei Stunden bei RT im (der Spezies der Primärantikörper entsprechenden) Sekundärantikörper inkubiert. Danach folgten erneute drei Waschgänge für fünf Minuten in TBS-T. Die Membranen wurden nun einzeln für eine Minute in selbst angesetztem ECL-Substrat (s. 2.1.4) inkubiert. Bei schwach exprimierten Proteinen erfolgte die Inkubation für fünf Minuten im *SuperSignal™ West Femto Substrat* (Thermo Scientific). Nach Entfernen des Substrats wurde im Fusion Solo S Imaging System (Vilber Lourmat) das von der Membran emittierte Licht detektiert.

2.2.5.6 *Reprobing und Stripping*

Grundsätzlich können auf einer geblotteten Membran verschiedene Proteine durch den Einsatz entsprechender Antikörper detektiert werden. Dazu können entweder verschiedene Primärantikörper gleichzeitig verwendet werden oder die Membran wird nach der Detektion eines ersten Proteins erneut über Nacht mit einem Antikörper gegen ein weiteres Protein inkubiert (sogenanntes *Reprobing*). Bei ähnlich großen Proteinen oder bei durch den ersten Primärantikörper erzeugten unspezifischen Banden, die auf der Höhe des danach zu detektierenden Proteins liegen, kann es dabei aufgrund der bereits gebundenen Antikörper und der Restaktivität der HRP des vorhergehenden Schrittes zu

Interferenzen kommen. Um diese zu vermeiden, müssen in einem Zwischenschritt die bereits gebundenen Antikörper von der Membran gelöst werden. Die dazu verwendeten Stripping-Puffer enthalten aggressive Substanzen (hier SDS und β -Mercaptoethanol), die in Verbindung mit hohen Temperaturen die Antikörper-Antigen-Bindung lösen. Da auch die Proteinbindung an die Membran betroffen ist, geht jedes Stripping mit einem Verlust von Proteinen einher und ist daher in seiner Anwendbarkeit limitiert. Zudem muss nach jedem Stripping ein erneutes Blocken mit Milchproteinen erfolgen, da unspezifische Bindungsstellen freigelegt werden.

Protokoll

Falls keine Interferenz zwischen vorhandenen Banden und der Bande des nächsten Proteins zu erwarten war, wurde die entsprechende Membran nach dem Imaging dreimal fünf Minuten in TBS-T gewaschen und dann erneut über Nacht in dem folgenden Primärantikörper inkubiert (*Reprobing*). Falls gestrippt werden musste, wurde zunächst viermal für fünf Minuten in TBS-T gewaschen. Danach wurden die Membranen für 30 Minuten bei 55°C in Stripping-Puffer (s. 2.1.4) eingeschweißt im Wasserbad inkubiert. Nach erneutem sechsmaligem Waschen in TBS-T wurde die Membran 20-30 Minuten in 5%-Milch-TBS-T-Lösung geblockt. Es folgte die erneute Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper über Nacht.

2.2.5.7 Auswertung

Zur Quantifizierung der Expression bestimmter Proteine wurde zunächst mittels der Software BIO-1D advanced (Vilber-Lourmat) das im Imager erfasste Bild densitometrisch ausgewertet. Die entsprechenden Densitometrie-Werte der einzelnen Banden der Ziel-Proteine wurden durch den Densitometrie-Wert einer Ladekontrolle (Vinculin oder α -Tubulin, vgl. auch die *Housekeeper* in 2.2.4.2) derselben Probe auf derselben Membran dividiert. Durch diese Relation zu einem konstitutiv exprimierten Referenzprotein werden mögliche Unterschiede in der aufgetragenen Proteinmenge zwischen den einzelnen Proben ausgeglichen. Dann wurde der Mittelwert dieser Quotienten in der Kontrollgruppe ermittelt. Dieser Mittelwert stellte dann die basale Expression eines Proteins dar (*fold change* = 1), anhand der im Folgeschritt die relative Expression (als „*fold change*“) eines Proteins in jeder einzelnen Probe bestimmt wurde. Die Division der jeweiligen Zielprotein/Housekeeper-Quotienten der einzelnen Proben durch diesen Mittelwert ergab den jeweiligen *fold-change*-Wert, der für die statistische Auswertung verwendet wurde (s. 2.2.7).

Bei der Untersuchung phosphorylierter Antikörper wurde von diesem Vorgehen abgewichen: Statt auf eine Ladekontrolle wird der Densitometrie-Wert der phosphorylierten Form hier zur Berechnung des *fold-change*-Wertes auf den des gesamten Proteins bezogen. Hier gibt der *fold-change*-Wert also keine Auskunft über die relative Expression, sondern über das Verhältnis phosphorylierten Proteins zum Gesamtprotein.

2.2.5.8 Zytokin-Array

Zur Untersuchung der Expression multipler Zytokine wurde das kommerzielle *Mouse XL Cytokine Array Kit* (R&D Systems) verwendet und nach Herstellerangaben vorgegangen. Bei diesem sind auf Nitrocellulose-Membranen Antikörper gegen 111 Zytokine je zweifach punktförmig nebeneinander aufgetragen. Diese binden die in den Gewebeproben vorhandenen Zytokine und binden sie so an die Membran. Die membrangebundenen Zytokine werden wiederum mittels biotinylierter Antikörper markiert. An das Biotin dieser Antikörper bindet HRP-gekoppeltes Streptavidin mit hoher Affinität. Nun kann analog zum Westernblot mittels einer ECL-Reaktion die Menge der gebundenen Zytokine durch Messung des emittierten Lichts ermittelt werden.

Zur Isolation der Proteine wurden die kompletten neonatalen Mausherzen in 300µl PBS + Protease-Inhibitor (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche) in 2 ml Homogenisator-Tubes transferiert, in denen sich Keramikkügelchen unterschiedlicher Größe befinden. Diese wurden im *Precellys Evolution* Homogenisator zweimal für 20s mit 5500 RPM geschüttelt (Pause 30s). Dem homogenisierten Gewebelysate wurde 1% (v/v) Triton X-100 zugefügt, die Proben über Nacht bei -80° C eingefroren und am nächsten Tag wieder aufgetaut. Dann wurden bei 4°C für fünf Minuten bei 14000 rpm Zellreste abzentrifugiert und der Überstand mit dem Proteinlysate abpipettiert. Daraufhin wurde mittels Lowry-Assay (siehe Kapitel 2.2.5.2) die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt. Für das Zytokin-Array wurden pro Herz 200µg Protein eingesetzt und damit eine Membran inkubiert, weiter wurde nach Herstellerprotokoll verfahren. Zur Detektion der ECL-Reaktion wurde der digitale Imager Fusion Solo S von Vilber Lourmat verwendet. Um einen Kompromiss zwischen Belichtungssensitivität und gleicher Behandlung der Membranen zu erzielen, wurden vier Membranen (je zwei aus jeder Gruppe) gleichzeitig belichtet.

Zur quantitativen Auswertung wurden in der Software Bio-1D (Vilber Lourmat) die densitometrischen Messwerte aller Punkte (inklusive negativ- und positiv-Kontrollen)

auf dem Zytokinarray gemessen. Die gemessenen Signalwerte wurden in Excel (Microsoft) weiter ausgewertet: Aus den beiden pro Zytokin gemessenen Punkte wurde jeweils der Mittelwert gebildet. Daraufhin wurde das Hintergrundsignal der Membran, ermittelt anhand des Signalwerts der Negativkontrolle, von diesem Mittelwert abgezogen. In Ermangelung einer als solchen definierten Ladekontrolle (im Sinne eines ubiquitär exprimierten Proteins) auf der Membran wurden die drei so genannten Positivkontrollen verwendet, um mögliche Unterschiede der Inkubations- und Belichtungsbedingungen auszugleichen: Die einzelnen Signalwerte der Zytokine wurden durch den Mittelwert der Positivkontrollen der jeweiligen Membran dividiert. Dieser Mittelwert der Positivkontrollen besitzt somit den Wert 1, die Expression der Zytokine wird in der Gesamtbetrachtung aller 111 Zytokine im Verhältnis dazu ausgedrückt. Dies ermöglicht zunächst auch einen Vergleich der Expression unterschiedlicher Zytokine auf einer Membran, da die Referenzgröße die gleiche ist. Mit den nach diesem Schritt erhaltenen normalisierten Werten wurde die statistische Auswertung durchgeführt.

Bei der genauen Betrachtung einzelner Zytokine hinsichtlich der Kontroll- und *cHccs*^{+/-}-Gruppe wurde in einem weiteren Schritt noch auf den Mittelwert des jeweiligen Zytokins der Kontrollgruppe normalisiert. Damit ergibt sich erneut ein leichter verständlicher *fold-change*-Wert, der die Expression eines Zytokins im *cHccs*^{+/-}-Herzen relativ zur Kontrollgruppe ausdrückt (>1 entspricht einer verstärkten Expression und <1 einer reduzierten Expression). Die statistische Auswertung (s. 2.2.7) wird durch diese Normalisierung nicht verändert, da etwaige Unterschiede sich im gleichen Verhältnis zueinander ändern.

2.2.6 Histologie

2.2.6.1 Immunfluoreszenzfärbung in Paraffinschnitten

Die Immunfluoreszenz(IF)-Färbung ermöglicht die Untersuchung von histologischen Schnitten auf bestimmte Antigene und somit Aussagen über die Expression und Lokalisation spezifischer Proteine im Gewebe (bis hin zur Lokalisation auf intrazellulärem Niveau) mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper. Die hier verwendeten Paraffinschnitte waren zuvor im Rahmen anderer Arbeiten eingebettet worden (Vorgehensweise beschrieben bei Hennig⁷¹). Zunächst müssen die Schnitte dazu rehydriert werden, da die Färbungen im wässrigen Medium stattfinden. Dazu wurden die Paraffinschnitte für 15-20 Minuten auf der Heizbank bei 60°C an den Objektträger „geschmolzen“, um ein Ablösen der Schnitte in späteren Arbeitsschritten zu verhindern.

Dann erfolgte die Deparaffinierung in Xylol (3x5min) und die Rehydrierung der Schnitte in absteigender Ethanolreihe (2x3min 99%, 3min 96% und 3min 70% Ethanol, dann 2x3 min H₂O).

Daraufhin wurden die Schnitte für 20 Minuten bei 90-100°C im Dampfkocher in Na-Citrat-Puffer inkubiert. Dadurch werden die bei der Paraffin-Einbettung entstandenen Aldehydbrücken gelöst und die Antigene des Gewebes wieder für Antikörperbindungen freigesetzt. Nach Abkühlen auf RT wurden die Objektträger dreimalig für fünf Minuten in TBS-T gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blocken, wurden die Gewebeschnitte nun für ein bis zwei Stunden bei RT mit Blocking-Lösung (5% (w/v) Ziegen Serum in Antikörperlösung) in der Feuchtkammer inkubiert. Dies dient der Blockade unspezifischer Bindungsstellen für den Sekundärantikörper (aus der Ziege gewonnen). Nach Entfernen der Blockierungslösung wurden die Schnitte über Nacht in der Feuchtkammer bei 4°C in der jeweiligen Primärantikörperlösung inkubiert. Bei gleichzeitiger Färbung mit verschiedenen Antikörpern wurden diese in der entsprechenden Verdünnung gemeinsam inkubiert. Um eine getrennte Detektion möglich zu machen, müssen die verwendeten Antikörper dabei aus unterschiedlichen Spezies stammen, um sie mit unterschiedlichen Fluorochromen markieren zu können. Zur Negativkontrolle eines Antikörpers wurden ein (nur Primärantikörper) oder zwei (bei zusätzlicher Doppel-Negativ-Kontrolle von Primär- und Sekundärantikörper) Objektträger über Nacht ohne den Primärantikörper in Antikörper-Lösung inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte wieder dreimalig für fünf Minuten in TBS-T gewaschen. Dadurch wird überschüssiger, nicht gebundener Antikörper entfernt. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Sekundärantikörpern für ein bis zwei Stunden bei RT in der Feuchtkammer. Die Sekundärantikörper sind mit Fluorochromen gelabelt und ermöglichen die spätere Detektion der Primärantikörper im Fluoreszenzmikroskop. Alle weiteren Schritte erfolgten zum Schutz vor Ausbleichen der Fluorochromen in abgedunkelten Gefäßen bzw. unter Minimierung der Lichtaussetzung. Nach erneutem dreimaligem Waschen und Entfernen der Waschlösung von den Objektträgern erfolgte das Eindeckeln mit Prolong™ Gold Antifade mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (Invitrogen). Dieses Eindeckelungsmedium, das die Signaldauer der Fluorochrome verlängert, enthält den Fluoreszenzfarbstoff DAPI, der Zellkerne blau anfärbt. Die Objektträger wurden danach für 24 Stunden im Dunkeln getrocknet.

Tyramide Signal Amplification (TSA)

Bei schwach exprimierten Zielantigenen oder starkem Hintergrundsignal durch Autofluoreszenz des Gewebes kann zur Signalverstärkung die TSA-Methode verwendet werden. Hierbei wird anstelle des Fluorochrom-gekoppelten-Sekundärantikörpers ein HRP-gelabelter Sekundärantikörper verwendet. Die Peroxidase katalysiert dann die Umwandlung eines Fluorochrom-gelabelten Tyramid-Derivats in ein reaktives Radikal. Dieses bindet kovalent an freie Tyrosinenden im umliegenden Gewebe und verbleibt somit nah am Sekundärantikörper und dem gesuchten Antigen. Da von einem HRP-Enzym multiple Reaktionen katalysiert werden, kommt es so zu einer deutlichen Signalverstärkung mit nur geringem Verlust der räumlichen Auflösung⁵³.

Wir verwendeten das *TSA® Plus Cyanine 3 System* (Perkin Elmer). Das Färbeprotokoll weicht dabei nur in wenigen Schritten von der normalen IF ab. Nach Anschmelzung der Schnitte, Deparaffinierung, Rehydrierung und dem Antigen-Retrieval wurden die Objektträger für 2 Minuten in TBS-T gewaschen. Dann wurde für 30 Minuten in 3% (v/v) Wasserstoffperoxidlösung in PBS inkubiert. Dadurch werden endogene Peroxidasen geblockt, die sonst ebenfalls das TSA-Fluorochrom umsetzen und ein starkes Hintergrundsignal verursachen würden. Die folgenden Schritte (Waschen, Blocken, Primärantikörperinkubation und Waschen) waren unverändert. Anstelle eines Fluorochrom-gelabelten Sekundärantikörpers wurde dann ein entsprechender HRP-konjugierter Antikörper gegen die jeweilige Spezies des Primärantikörpers verwendet. Nach erneutem dreimaligem Waschen für fünf Minuten in TBS-T wurden die Schnitte für acht bis zehn Minuten in dem 1:50 im mitgelieferten Puffer verdünnten TSA-Farbstoff inkubiert. Nach abschließenden drei Waschschritten in TBS-T erfolgte unverändert das Eindeckeln in Prolong Gold mit DAPI. Die Antikörperlösung muss hier für alle Schritte ohne Natriumazid angesetzt werden, da dieses mit der Peroxidasereaktion interferiert.

2.2.6.2 Bildgebung

Fluoreszenzbilder wurden mit dem Axio Observer Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) aufgenommen. Dabei kann durch den gezielten Einsatz von Filtern für das anregende und emittierte Licht jeweils ein spezifisches Fluorochrom sichtbar gemacht werden. Bilder von gleich gefärbten Schnitten eines Versuchs wurden dabei mit identischen Aufnahmeeinstellungen in den jeweiligen Farbkanälen digital aufgenommen. In P1-Herzen wurden Myokardabschnitte des linken Ventrikels (Septum und Wand des linken Ventrikels sowie apikaler Bereich) untersucht. Im E13.5-Herzen ist eine klare

Identifizierung des linken Ventrikels allein anhand morphologischer Kriterien nicht möglich, dort wurde das gesamte Myokard untersucht. In neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen wurden Cytochrom-c-negative Areale bzw. HSP-60-positive Areale aufgesucht, um den Unterschied zwischen HCCS-defizienten- und gesunden Zellen beurteilen zu können. In den Kontrollherzen wurden zufällige Areale in ähnlichen anatomischen Bereichen aufgesucht. Bilder wurden mit 20- und 40-facher Vergrößerung (Objektive Plan-Apochromat 20x/0.8 M27, N-Achroplan 40x/0,65 M27, Zeiss, Kamera Axioacam 503 mono) aufgenommen und die Färbemuster qualitativ beurteilt.

2.2.6.3 SA- β -Galaktosidase-Färbung

Das verwendete Färbeprotokoll ist adaptiert von Debacq-Chainiaux et al.⁴¹. Die Aktivität des Enzyms β -Galaktosidase kann durch Umsatz des synthetischen Substrats X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) histologisch nachgewiesen werde. X-Gal wird durch die Galaktosidase zu 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol gespalten, was zu 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert wird. Dieser stabile blaue Farbstoff ist dann lichtmikroskopisch nachweisbar. Im Unterschied zur in vielen Zellen vorkommenden sauren Variante der β -Galaktosidase (pH-Optimum 4,0) lässt sich die sogenannte Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase (SABG) bei einem pH-Optimum von 6,0 anfärben. Dementsprechend findet die Färbung bei diesem pH-Wert statt. Der Nachweis von SABG basiert auf einer enzymatischen Umsetzung, die im Vergleich zum bloßen Vorkommen eines Proteins instabil ist. Zudem stoppt eine Einbettung in Paraffin jegliche Enzym-Aktivität. Daher wurde der Nachweis an frischem und gefrier-eingebettetem Gewebe durchgeführt.

Die verwendeten Organe (Herzen, zusätzlich Nieren als Positiv-Kontrolle) wurden direkt nach ihrer Präparation in flüssigem Stickstoff schockgefroren, in Optimum Cutting Temperature Compound (OCT, Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound, Sakura Finetek) eingebettet und wiederum in Stickstoff gefroren. Nach Akklimatisierung auf -20°C für zwei Stunden im Gefrierschrank wurden bei -20°C im Kryotom (Microm International) 8 μ m-Schnitte angefertigt, auf positiv geladene Objektträger übertragen und für eine Minute in 1% (v/v) PFA/PBS fixiert. Danach erfolgten drei Waschschrte für je eine Minute in PBS. Die Schnitte wurden dann über Nacht bei 37°C in X-Gal-Färbelösung inkubiert. Diese enthält bei einem pH von 6,0 das Substrat X-Gal und als Katalysatoren der Oxidation Kaliumhexacyanoferrat (II und III). Am nächsten Tag wurden die Schnitte nach erneutem dreimaligem Waschen (je eine Minute) in PBS mit Roti Mount (Carl Roth

GmbH) eingedeckelt. Die Schnitte wurde dann im Hellfeld und Phasenkontrast mikroskopisch im Axio Observer Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) in 10x und 20x-facher Vergrößerung (Objektive N-Achroplan 10x/0,25 Ph1 M27, LD A-Plan 20x/0.35 Ph 1, Zeiss, Kamera AxioCam 305 color) qualitativ auf blau gefärbte Zellen untersucht.

2.2.7 Statistische Methoden

Zur Statistischen Auswertung und grafischen Darstellung der Daten wurden Microsoft® Excel 15.23 und Prism 8.1.2 (GraphPad Software) verwendet. Die quantitativen Ergebnisse aus Protein- und RNA-Analysen werden im Text als Mittelwert±Standardfehler (*standard error of the mean, SEM*) und graphisch durch Mittelwert und SEM-Balken dargestellt. Die einzelnen Werte sind als Punkte dargestellt. Zur Auswertung wurden die normalisierten Werte (zur Unterscheidung in den Diagrammen bei Westernblots als *fold change*, bei qPCR-Daten als *relative Expression* bezeichnet) zunächst mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung innerhalb der *cHccs*^{+/-} und Kontrollgruppe getestet. Normalverteilte Daten wurden mit F-Test auf Varianzhomogenität zwischen den beiden Gruppen überprüft, bei homogener Varianz wurde ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test durchgeführt, bei inhomogener Varianz der korrigierte t-Test nach Welch. Unterschiede zwischen nicht normalverteilten Datensätzen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test untersucht.

Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert unter 0,05 angenommen und entsprechende Datensätze mit einem * (p<0,05) bzw. ** (p<0,01) markiert.

Die Werte des Zytokin-Arrays wurden in Prism 8.1.2 (GraphPad Software) auf statistische Unterschiede zwischen *cHccs*^{+/-} und Kontrollgruppe analysiert. Dazu wurde der mittels FDR-Ansatz nach Benjamini, Krieger und Yekutieli auf multiples Testen korrigierte T-Test¹⁶ (mit Q = 1% und ohne Annahme einer konsistenten Standardabweichung) verwendet. Die Korrektur auf multiples Testen ist notwendig, da aufgrund der hohen Anzahl untersuchter Proteine bei reiner Anwendung eines t-Tests statistisch falsch positive Ergebnisse (fälschlicherweise als signifikant eingestufte Unterschiede) auftreten würden: Bei 111 untersuchten Zytokinen und einem Signifikanzniveau (also einem α -Fehler) von 0,05 ist ohne Korrektur für Multiples Testen allein durch Zufall mit 6 als signifikant eingeschätzten Unterschieden zu rechnen, ohne das ein tatsächlicher Unterschied besteht. Die Korrektur auf multiples Testen korrigiert dieses Problem⁷⁶. Die Analyse mittels FDR-Ansatz ergibt anstelle des p-Wertes einen analogen q-Wert, statt signifikanter Unterschiede findet die Methode sogenannte „*Discoveries*“.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte die Rolle von zellulärer Seneszenz in embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen im Vergleich zu gesunden Kontrollherzen charakterisiert werden. Untersucht wurden dazu verschiedene Marker der zellulären Seneszenz und beteiligter Signalwege. Besonderes Augenmerk lag dabei auch auf dem Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp und inflammatorischen Zytokinen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen sollen hier gegliedert in einzelne Bestandteile der bereits beschriebenen Stoffwechselprozesse zellulärer Seneszenz dargestellt werden (s. 1.2.3) – Induktion, SASP/Inflammation und Zellzyklusinhibition.

3.1 Induktion des Seneszenzprogramms

Zelluläre Seneszenz kann durch unterschiedlichste Faktoren ausgelöst werden. Wesentlich ist dabei die unter 1.2.3.1 beschriebene *DNA-Damage-Response* (DDR), deren Marker γ -H2A.X untersucht wurde. Auch der Energiesensor AMPK wurde aufgrund seiner möglichen Verknüpfung mit dem *cHccs*-KO und zellulärer Seneszenz überprüft. Beide – also DDR und AMPK – führen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53, der ebenfalls analysiert wurde.

3.1.1 γ -H2A.X weist auf aktivierte DDR im neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen hin

Das Histon H2A.X ist Bestandteil des Histonkerns der Nukleosome, um den die DNA im Zellkern gewickelt ist. Seine Bedeutung als Marker für DNA-Schäden ergibt sich aus der Eigenschaft, dass H2A.X bei Doppelstrangbrüchen und in geringerem Ausmaß bei Einzelstrangbrüchen der DNA durch die Kinasen ATM und ATR an Serin 139 phosphoryliert wird. Diese auch als γ -H2A.X bezeichnete Variante dient allgemein als Marker für DNA-Schäden und Aktivierung der DDR⁹⁶. Im weiteren Sinne fungiert sie damit auch als Seneszenz-Marker^{4,78}, wenn auch mit geringer Spezifität, da DNA-Schäden nicht mit zellulärer Seneszenz gleichzusetzen sind¹⁵⁶. γ -H2A.X kann aber in Zusammenspiel mit anderen Markern der zellulären Seneszenz deren Aussage stützen und vor allem ein Hinweis auf DNA-Schädigung als Auslöser zellulärer Seneszenz sein. Mittels Untersuchung des Herzgewebes auf γ -H2A.X im Westernblot und der IF-Färbung wurde so überprüft, ob die mitochondriale Schädigung im Herzen der *cHccs*-KO-Mäuse

zu DNA-Schäden und einer konsekutiven DDR führt und als Ursache für zelluläre Seneszenz in Frage kommt.

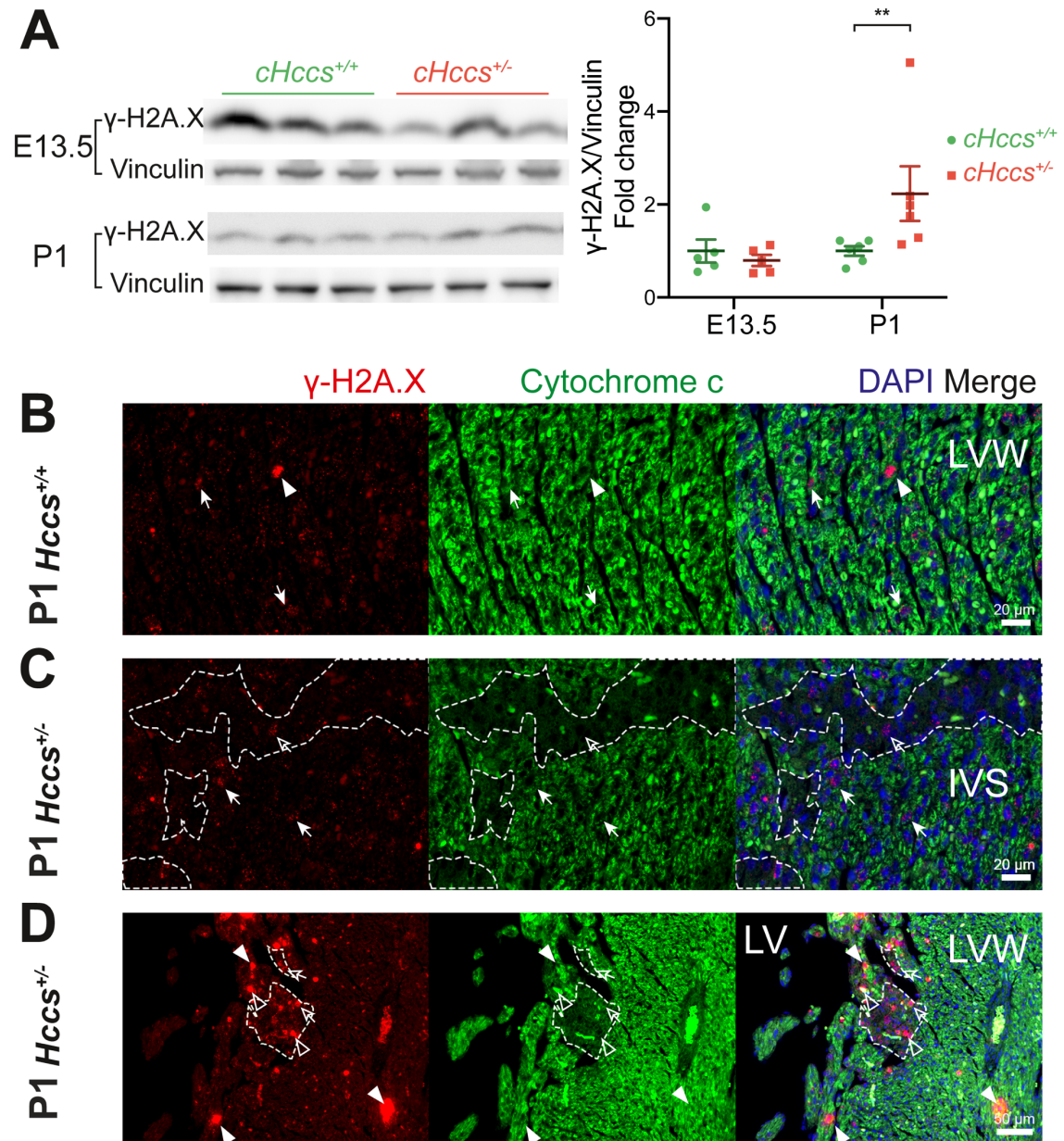


Abbildung 8: Der DDR-Marker γ -H2A.X ist im neonatalen $cHccs^{+/-}$ -Herzen verstärkt nachweisbar, eine Assoziation mit KO-Zellen nicht eindeutig feststellbar

A Der DDR- und Seneszenz-Marker γ -H2A.X war in der Proteinexpressionsanalyse des embryonalen Herzens nicht erhöht, im neonatalen Herzen zeigte sich eine hochsignifikante Heraufregulation. Bildausschnitte der Westernblots, $n=5$ (E13.5) bzw. $n=6$ (P1) pro Gruppe, Quantifizierung durch Normalisierung auf Vinculin. **B-D** Immunfluoreszenzfärbung im neonatalen Herzen. In der Immunhistologie zeigten sich sowohl in $Hccs^{+/+}$ -Herzen (**B**) als auch in $cHccs^{+/-}$ -Herzen (**C+D**) vereinzelt stark γ -H2A.X-positive Kerne (Pfeilspitzen) und vielfach schwächere γ -H2A.X-positive Kerne (Pfeile). Diese waren sowohl in CytC-positiven Zellen (ausgefüllte Indikatoren) als auch in CytC-negativen Zellen (gestrichelte Umrandung) zu finden (nicht ausgefüllte Indikatoren). In der linksventrikulären Wand eines $cHccs^{+/-}$ -Herzen zeigte sich eine Assoziation zwischen CytC-negativen-Zellen und der γ -H2A.X-Anfärbung, die aber insgesamt nicht feststellbar war (**D**). $n=2$ untersuchte Herzen pro Gruppe. IVS – interventrikuläres Septum, LV – linker Ventrikel, LVW – linksventrikuläre Wand.

Im Westernblot zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vorkommen von γ -H2A.X im Herzgewebe *embryonaler* Kontroll- und *cHccs*^{+/-}-Mäuse zum Zeitpunkt 13.5 dpc. In den Herzen von *neonatalen cHccs*^{+/-}-Mäusen (P1) konnte hingegen hochsignifikant mehr γ -H2A.X mit einer relativen Zunahme von $2,23 \pm 0,59$ ($p < 0,01$) im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abbildung 8A). In einem zweiten Westernblot (biologisches Replikat, also andere, unabhängige Proben) bestätigte sich die signifikante Heraufregulation, wenn auch mit geringerem Unterschied zwischen den Gruppen (f_c $1,28 \pm 0,09$, $p < 0,05$, nicht abgebildet). Diese Westernblot-Daten weisen auf vermehrte DNA-Schäden im neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen hin.

Um diese DNA-Schäden genauer zu lokalisieren, wurde daraufhin in P1-Herzen eine immunhistologische Untersuchung angeschlossen. Hier kann die γ -H2A.X-Färbung einzelner Zellkerne eine aktivierte DDR auf Zellebene differenziert nachweisen. Neben der Färbung mit einem γ -H2A.X-Antikörper wurde zeitgleich gegen Cytochrom c gefärbt. Durch den *cHccs*-KO können Kardiomyozyten, in denen das gesunde X-Chromosom deaktiviert wurde (KO-Zellen), kein CytC synthetisieren (siehe 2.2.1). Eine fehlende Anfärbung durch den CytC-Antikörper zeigt im Myokard von *cHccs*^{+/-}-Herzen also HCCS-defiziente Zellen an und ermöglicht so die Unterscheidung von gesunden und KO-Zellen.

In der Immunfluoreszenz-Färbung zeigten sich sowohl in *cHccs*^{+/-}- als auch in Kontrollherzen vereinzelt stark γ -H2A.X-positive Kerne ohne klare Zuordnung zu CytC-negativen oder -positiven Zellen und in vielen Zellen eine dezentere γ -H2A.X-Kernfärbung (Abbildung 8 B-C). Dieses dezente Kernsignal war in der freien Wand eines untersuchten *cHccs*^{+/-}-Herzens in CytC-negativen Arealen gehäuft zu finden (Abbildung 8 D). Eine generelle Assoziation konnte aber daraus nicht abgeleitet werden, da sich die meisten CytC-negativen Areale in ihrer γ -H2A.X-Anfärbung von CytC-positiven Bereichen nicht unterschieden (Abbildung 8 B).

3.1.2 Kein Hinweis auf Energiemangel als Auslöser zellulärer Seneszenz im neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen

Neben einer erhöhten ROS-Produktion existieren weitere Wege, über die mitochondriale Defekte zelluläre Seneszenz verursachen. So kann die dysfunktionale Adenosin-5-triphosphat(ATP)-Synthese geschädigter Mitochondrien zur Aktivierung von *5'-adenosine-monophosphate(AMP)-activated protein kinase* (AMPK) führen, einem Energiesensor und zentralem Metabolismus-Regulator der Zelle. AMPK misst das

Verhältnis zwischen AMP und ATP und wird bei einem ATP-Mangel durch den ansteigenden AMP-Spiegel aktiviert. Eine dauerhafte Aktivierung von AMPK kann, neben zahlreichen anderen Effekten auf den zellulären Metabolismus, p53-vermittelt zu zellulärer Seneszenz führen^{25,184}. Um zu überprüfen, ob dieser Mechanismus als Ursache für zelluläre Seneszenz in *cHccs*^{+/-}-Herzen in Frage kommt, wurde die Aktivierung von AMPK α – der katalytischen Untereinheit von AMPK - durch Phosphorylierung an Thr172 (p-AMPK α) im Western Blot untersucht.

Im *embryonalen* Herzen zeigte sich hier in zwei durchgeführten Westernblots (mit zum Teil unterschiedlichen Proben) keine Veränderung der Aktivierung von AMPK zwischen *cHccs*^{+/-}- und Kontrollgruppe (*fc* 1,06 \pm 0,09 bzw. 0,75 \pm 0,15). Im *neonatalen* Herzen war zwar eine Tendenz zur Aktivierung in *cHccs*^{+/-}-Herzen im Vergleich zur Kontrolle vorhanden (*fc* 1,56 \pm 0,66 bzw. 1,30 \pm 0,37), diese erreichte aber bei starker Streuung der Werte keine statistische Signifikanz (*p*=0,240 bzw. 0,558).

Im embryonalen *cHccs*^{+/-}-Herzen scheint somit gemessen an der AMPK-Aktivierung kein Energiemangel vorzuliegen. Dies entspricht den Daten von Magarin et al., die keinen Unterschied in den ATP-Leveln embryonaler *cHccs*^{+/-}-Herzen im Vergleich zur Kontrolle feststellen konnten¹¹⁰.

Die in der Tendenz nachweisbare Aktivierung von AMPK α im neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen könnte trotz fehlender statistischer Signifikanz einem Energiemangel in einem Teil der Kardiomyozyten entsprechen. Dies ließe sich möglicherweise, wie bereits unter 3.1.1 angesprochen, durch die unterschiedliche Form der Energiegewinnung erklären: Ein mitochondrialer Defekt hat im Neonaten durch den verstärkten Gebrauch der Atmungskette vermehrten Einfluss auf die Bereitstellung von ATP. Die vermehrte Druckbelastung des neonatalen Herzens⁸⁰ könnte aufgrund des höheren Energiebedarfs ebenfalls zu einem relativ zum Embryo verstärkten Effekt des *cHccs*-KO im Neonaten beitragen. Aufgrund der fehlenden statistischen Signifikanz und der zahlreichen anderen Funktionen von AMPK im Metabolismus der Zelle⁶⁷ muss dies aber als sehr spekulativ bezeichnet werden. Weitere Untersuchungen – wie zum Beispiel immunhistologische Untersuchungen, die Aufschluss über die Lokalisation einer evtl. Aktivierung von AMPK geben könnten – könnten diese Einschätzung allerdings noch verändern. Aufgrund der hier erhobenen Daten kann AMPK als Auslöser zellulärer Seneszenz allerdings nicht in Betracht gezogen werden.

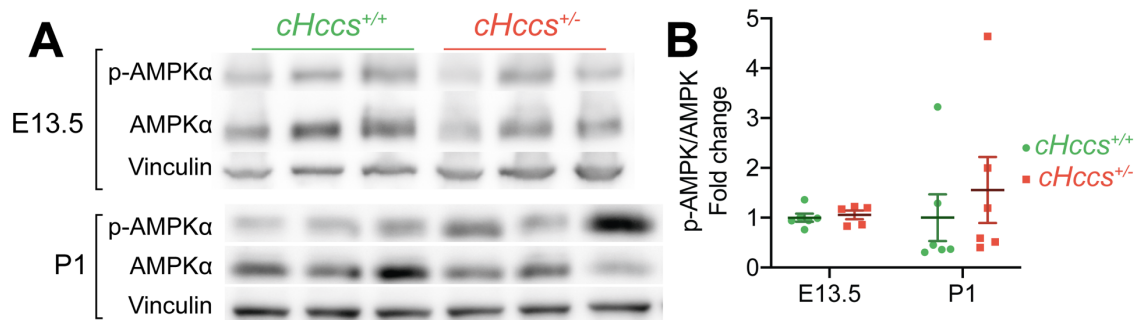


Abbildung 9: AMPK zeigt keine signifikante Aktivierung im embryonalen oder neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen im Vergleich zur Kontrollgruppe

Im embryonalen (E13.5) Herzen zeigt sich keine Veränderung der Phosphorylierung von AMPK durch den *cHccs*-KO im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im neonatalen (P1) Herzen bleibt die tendenzielle Aktivierung in *cHccs*^{+/-}-Herzen aufgrund starker Streuung in beiden Gruppen statistisch nicht signifikant. **A** Beispielhafte Westernblot-Banden **B** Quantifizierung durch Normalisierung von p-AMPKα auf AMPKα gesamt. n=5-6 pro Gruppe.

3.1.3 p53, zentraler Transkriptionsfaktor der DDR und zellulärer Seneszenz, ist im *cHccs*^{+/-}-Herzen unverändert

Der Transkriptionsfaktor p53 ist sowohl für die DDR als auch für den AMPK-Signalweg im Rahmen zellulärer Seneszenz relevant. Er ist klassischerweise bekannt für seine tragende Funktion als „Wächter des Genoms“⁹⁹. Das p53-Gen gehört mit p16 zu den am häufigsten mutierten Genen in Tumorzellen⁴, was auf seine wichtige Rolle als Proliferationsinhibitor hindeutet. p53 induziert bei DNA-Schäden die Expression von DNA-Reparatur-Proteinen und verhindert zudem die Proliferation der betroffenen Zelle, damit die Vererbung des DNA-Schadens und die Entstehung maligner Tumore⁸⁷. Die DDR aktiviert bzw. stabilisiert p53, welches wiederum die Transkription des Zellzyklusinhibitors p21 induziert (s. 1.2.3.1 und 1.2.3.2). Durch diese zunächst temporäre Zellzyklusinhibition erhält die Zelle die Möglichkeit, DNA-Schäden zu reparieren. Gelingt dies nicht, wird Apoptose oder zelluläre Seneszenz eingeleitet. Die Prozesse, die über das Schicksal der Zelle entscheiden, sind noch unzureichend bekannt, p53 ist als Transkriptionsfaktor aber sowohl für die DNA-Reparatur, Apoptoseinduktion als auch die Einleitung zellulärer Seneszenz relevant⁸⁷. Bei Energiemangel der Zelle wird p53 wiederum durch AMPK aktiviert und verhindert somit die energieaufwändige Proliferation^{81,184}. Aufgrund seiner tragenden Rolle wurde p53 sowohl hinsichtlich seiner Transkription als auch Protein-Expression untersucht.

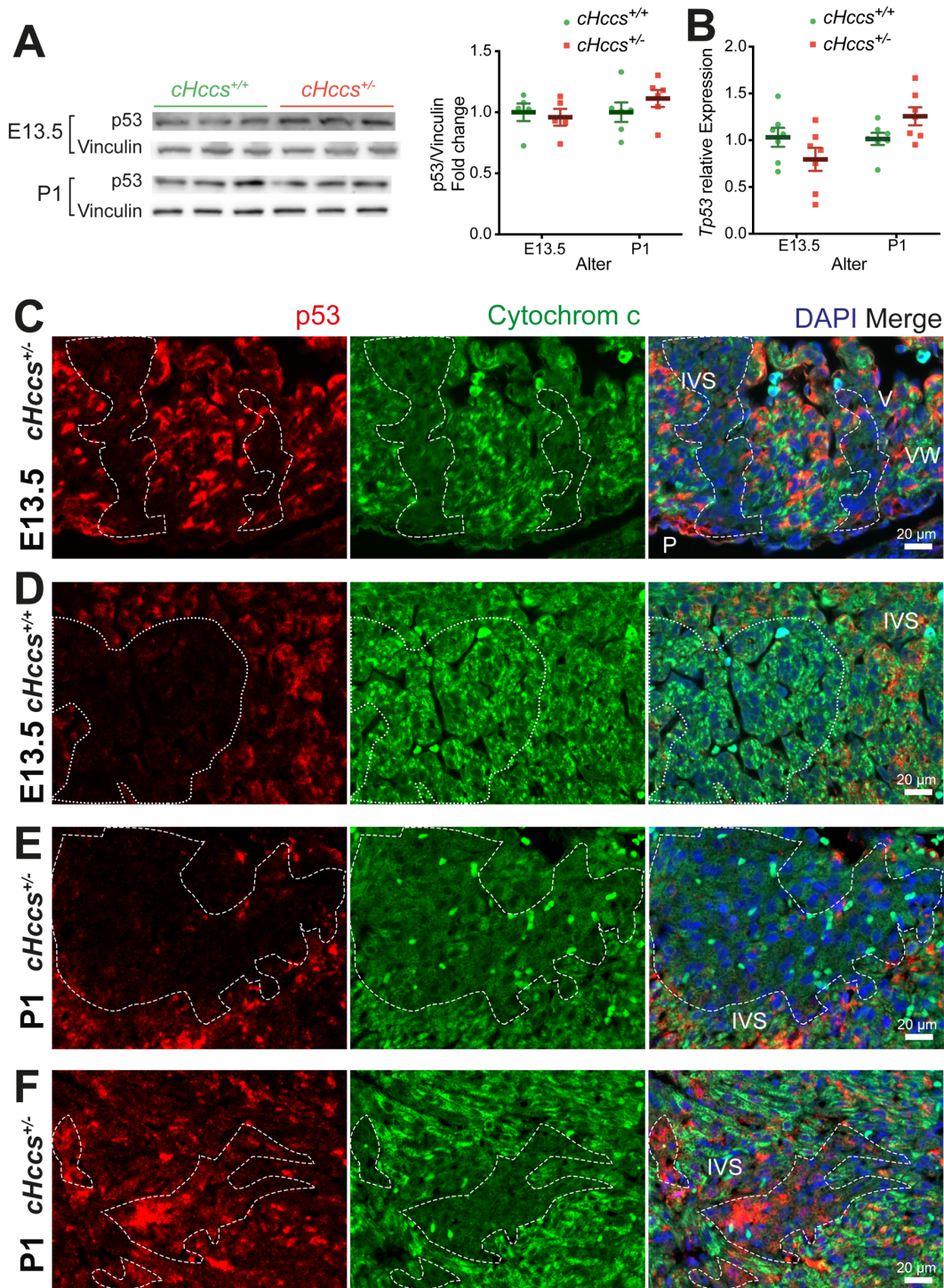


Abbildung 10: p53, der wichtigste Transkriptionfaktor der DDR und Vermittler der zellulären Seneszenz, ist im *cHccs*^{+/-}-Herzen nicht verändert
p53 zeigte weder in der Proteinanalyse im Westernblot [A, n=5 (E13.5) bzw. 6 (P1) pro Gruppe] noch in der mRNA-Analyse in der qPCR (B, n=7 pro Gruppe) signifikante Unterschiede zwischen *cHccs*^{+/-}- und Kontrollgruppe. C-F Die Immunfluoreszenzfärbung war aufgrund heterogener Anfärbung nicht aufschlussreich. Zwar waren sowohl im embryonalen (C) als auch neonatalen (E) *cHccs*^{+/-}-Herzen Cytochrom-c-defiziente Bereiche (gestrichelte Linie) zu finden, die ein abgeschwächtes *p53*-Signal aufwiesen. Allerdings fanden sich ähnliche Areale mit schwacher *p53*-Anfärbung (gepunktete Linie) auch in Kontrollherzen (D), zudem fanden sich auch Cytochrom-c-defiziente Bereiche (gestrichelte Linie) im neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen, die verstärkt *p53* anfärbten (F). Insbesondere fand sich keine klare Kernfärbung (DAPI in blau als nukleärer Marker), insgesamt präsentierte sich die *p53*-Färbung als inhomogen. 4 beurteilte Herzen pro Gruppe. IVS – interventrikuläres Septum, P – Perikard, V – Ventrikel, VW – Ventrikelwand.

Im Westernblot konnte dabei sowohl in embryonalen als auch neonatalen Herzen kein Unterschied zwischen *cHccs*^{+/-}- und Kontrollgruppe gefunden werden (Abbildung 10A). Die mRNA-Analyse von *Tp53*, dem für p53 kodierenden Gen, in der qPCR wies ebenfalls keinen *signifikanten* Unterschied zwischen den beiden Gruppen auf, allerdings zeigte sich im neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen in der Tendenz eine Heraufregulation der *Tp53*-Transkription um den Faktor $1,26 \pm 0,1$ ($p=0,059$) (Abbildung 10B).

Die Immunfluoreszenz-Untersuchung embryonaler und neonataler Herzen war leider aufgrund sehr heterogener Färbemuster wenig aufschlussreich. Zwar zeigte sich häufig eine – bemerkenswerterweise – *schwächere* p53-Anfärbung in Cytochrom-c-defizienten Bereichen embryonaler und neonataler *cHccs*^{+/-}-Herzen (Abbildung 10C und E). Gleichzeitig fanden sich allerdings auch stark *p53-positive* Cytochrom-c-defiziente Areale (Abbildung 10F), zudem traten auch in Kontrollherzen Areale mit stark abgeschwächtem p53-Signal auf (Abbildung 10D). Insgesamt war die p53-Anfärbung außerdem inhomogen und keinem Zellkompartiment zuzuordnen, insbesondere war keine klare nukleäre p53-Färbung auszumachen. In der Zusammenschau ließ sich aufgrund dieser heterogenen Bilder durch die Immunfluoreszenzfärbung keine belastbare Aussage zur p53-Expression in *cHccs*^{+/-}-Herzen bzw. zur p53-Lokalisation in HCCS-defizienten Kardiomyozyten treffen.

Zusammenfassend geben die erhobenen Daten keinen Anhalt für eine veränderte Regulation der RNA- und Proteinexpression von p53 in embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen im Vergleich zur Kontrolle. Aufgrund der fehlenden Aussagekraft der IF-Signale könnte allerdings die Untersuchung mit einem anderen Antikörper weitere Erkenntnisse liefern.

3.2 SASP und Inflammation

Die auto- und parakrinen Effekte der zellulären Seneszenz werden über ein spezielles inflammatorisches Sekretom, den sogenannten Seneszenz-assoziiertem sekretorischen Phänotyp (SASP) vermittelt (s. 1.2). Reguliert wird dieser wesentlich von p38MAPK und NFκB (s. 1.2.3.3 und 1.2.3.4). Die Botenstoffe des SASP setzen sich aus den unterschiedlichsten Zytokinen zusammen (s. 1.2.3.5). Sowohl regulatorische Proteine als auch verschiedene Zytokine wurden hier untersucht, um die Existenz und gegebenenfalls den Einfluss des SASP auf das *cHccs*^{+/-}-Herz zu überprüfen.

3.2.1 Kein Anhalt für veränderte Regulation des p38MAPK-Signalwegs in *cHccs*^{+/-}-Herzen

p38MAPK (auch kurz p38) sind eine Familie von Kinasen, die sich in vier Subtypen einteilen lassen (p38 α - δ). Ihre Aktivierung erfolgt vor allem durch Zellstress (u.a. oxidativen Stress) und Zytokine, aber auch durch Wachstumsfaktoren. Sie sind zentraler Bestandteil der Stressantwort, aber auch beteiligt an Inflammation, Zellzyklusregulation und Zytoskelettanpassung³⁴. Während die Aktivierung von p38MAPK bei Zellstress meist akut und transient geschieht, konnte in seneszenten Zellen eine verzögerte und anhaltende Aktivierung gezeigt werden, die über NF κ B den SASP induziert. Diese Induktion ist DDR- und p53-unabhängig⁵⁹. Neben der Aktivierung von NF κ B stabilisiert p38MAPK auch posttranskriptionell durch mRNA-Stabilisierung der entsprechenden Transkripte den SASP¹. p38MAPK wird zudem die verknüpfende Rolle zwischen mitochondrialer Dysfunktion, ROS und zellulärer Seneszenz zugeschrieben, wenn auch im Kontext von Alter und altersbezogenen Erkrankungen¹³⁴. Bemerkenswerterweise ist eine Funktion von p38MAPK als negativer Regulator von Kardiomyozyten-Proliferation beschrieben worden^{49,82}. Die Aktivierung von p38MAPK geschieht durch Phosphorylierung, die klassischerweise, aber nicht ausschließlich durch die sogenannten *MAPK kinases* (MKK) katalysiert wird³⁴.

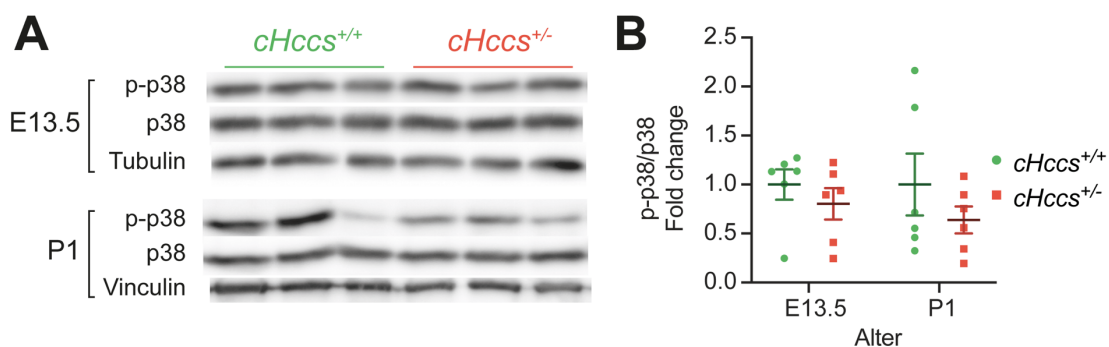


Abbildung 11: Keine Aktivierung von p38MAPK in *cHccs*^{+/-}-Herzen nachweisbar
 Die Untersuchung der Aktivierung von p38MAPK durch Phosphorylierung an Thr180/Tyr182 zeigte keine signifikante Veränderung im embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen im Vergleich zu Kontrolle. **A** Ausschnitte jeweils eines Westernblots, *n*=6 pro Gruppe **B** Quantifizierung des Westernblots aus **A** durch Normalisierung von phospho-p38 auf Gesamt-p38, *n*=6 pro Gruppe.

In der vorliegenden Arbeit wurde p38MAPK in embryonalen und neonatalen Herzen im Westernblot auf seine Aktivierung durch Phosphorylierung an Thr180/Tyr182 (p-p38) untersucht. Weder in E13.5- noch in P1-Herzen konnte eine Regulierung der p38MAPK-Phosphorylierung im Sinne eines signifikanten Gruppenunterschiedes zwischen *cHccs*^{+/-}- und Kontrollherzen festgestellt werden (Abbildung 11). Auffällig war in allen

Untersuchungen eine relativ große Streuung der Aktivierung (SEM zwischen 0,12 und 0,5). Möglicherweise deutet dies darauf hin, dass p38MAPK im embryonalen und neonatalen Herzen durch andere Stimuli reguliert wird, der *cHccs*-KO dabei aber keine übergeordnete Rolle spielt.

3.2.2 *cHccs*^{+/-}-Herzen und HCCS-defiziente-Zellen zeigen keine veränderte NFκB-Aktivierung, aber erhöhte IκBα-Spiegel

NFκB ist eine Proteinfamilie aus fünf verschiedenen Untereinheiten (s. 1.2.3.3). Diese üben in Kombination als Homo- oder Heterodimere als Transkriptionsfaktoren eine regulatorische Funktion in verschiedenen Kontexten wie Inflammation, Wachstum oder Stressantwort aus. Alle NFκB-Untereinheiten [p105/p50 (NF-κB1), p100/p52 (NF-κB2), RELA (p65), RELB und REL] besitzen eine N-terminale DNA-Bindungsstelle, über die ihre transkriptionale Aktivität vermittelt wird. Unter Normalbedingungen wird NFκB durch IκB-Proteine in inaktiver Form im Zytoplasma gebunden. Der kanonische Weg der NFκB-Aktivierung führt durch Phosphorylierung und konsekutiven proteasomalen Abbau von IκB zur Freisetzung, Aktivierung und nukleären Translokation von NFκB¹⁵². Darüber hinaus können zahlreiche posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung oder Acetylierung die Aktivität von NFκB modulieren^{146,152,177}. Die Aktivierung von NFκB im Rahmen der Seneszenz ist über verschiedene Signalwege, darunter die DDR und p38MAPK beschrieben¹⁴⁶. Der NFκB-Signalweg wird als „*master regulator*“ des SASP bezeichnet, weil bisherige Untersuchungen ihm eine zentrale Rolle als Transkriptionsfaktor von SASP-Genen zuweisen^{26,146}.

Die Aktivität des NFκB-Signalwegs in embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}-Mäusen wurde im Westernblot durch Untersuchung der Phosphorylierung von p65 an Ser536 (p-p65)²⁶ und der Phosphorylierung von IκBα an Ser32 analysiert. Zusätzlich wurde in der Immunfluoreszenz Gesamt-p65 als auch Gesamt-IκBα im Myokard untersucht.

Im Westernblot zeigte sich in embryonalen *cHccs*^{+/-}-Herzen keine Veränderung der p65-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle (*f*c 0,86±0,12, p=0,51). Eine Veränderung der Aktivierung von NFκB durch den *cHccs*-KO scheint im embryonalen Herzen somit nicht stattzufinden. In neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen war in keinem der drei durchgeführten Westernblots (biologische und technische Replikate) eine Veränderung der Phosphorylierung von p65 im Vergleich zur Kontrolle feststellbar (Abbildung 12 A+B).

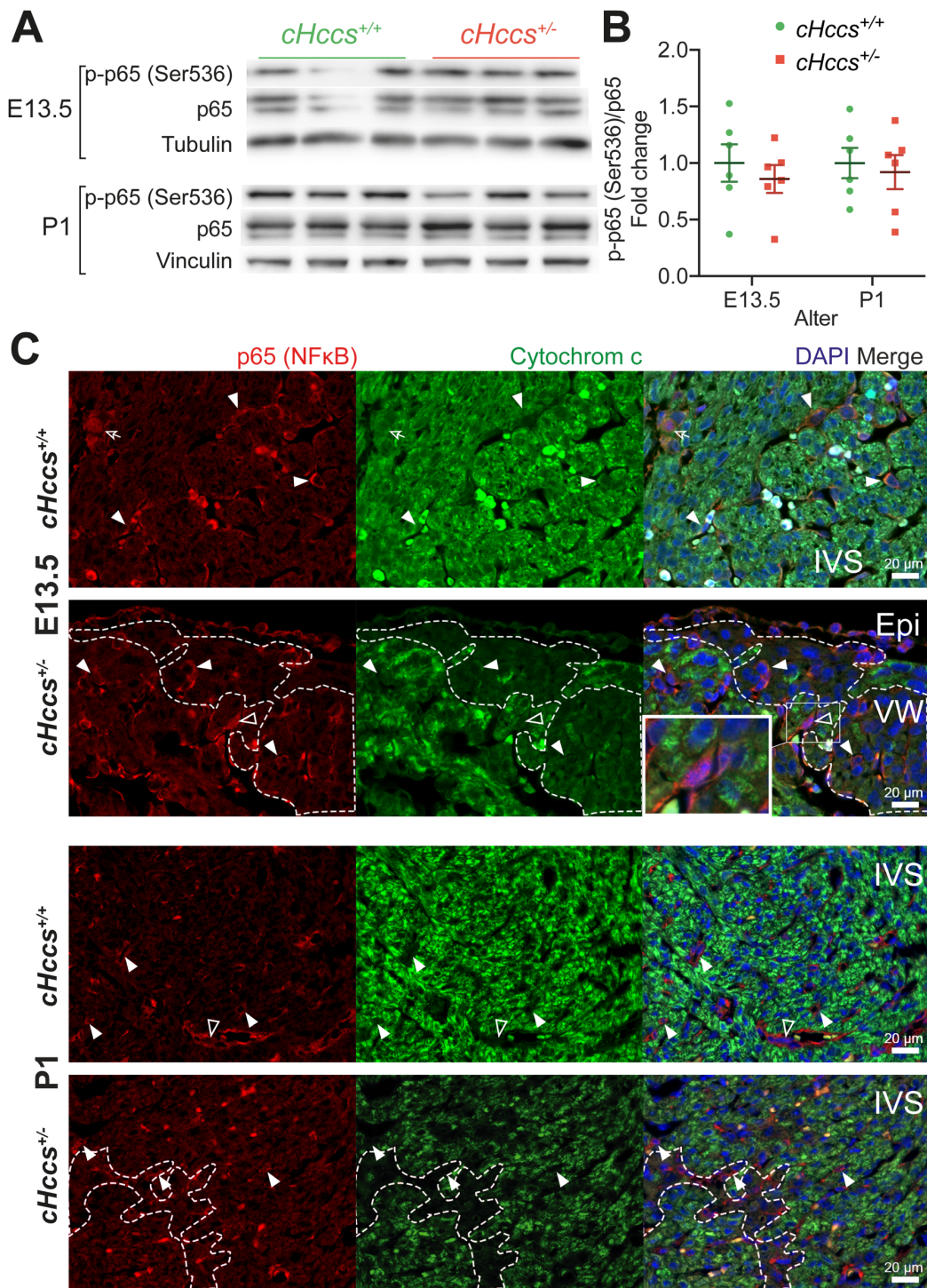


Abbildung 12: Keine Anzeichen für NFκB-Aktivierung in *cHccs*^{+/-}-Herzen

A+B Die Untersuchung der Aktivierung von NFκB durch Phosphorylierung von p65 an Ser536 im Westernblot zeigte keinen Anhalt für eine Aktivierung des NFκB-Signalwegs in embryonalen oder neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen. **A** Exemplarischer Ausschnitt je eines Westernblots von p-p65, p65 und Ladekontrolle **B** Quantifizierung durch Normalisierung von p-p65 auf Gesamt-p65. n=6 pro Gruppe **C** Immunhistologischer Nachweis von p65 im Herzen embryonaler (E13.5) und neonataler (P1) Kontroll- und *cHccs*^{+/-}-Herzen. Die p65-positiven Zellen grenzen an ein Lumen und entsprechen vermutlich Endothelzellen (P1) bzw. Endokardzellen (E13.5). Größtenteils ist die Färbung dabei zytoplasmatisch betont (ausgefüllte Pfeilspitzen), vereinzelt auch nukleär (leere Pfeilspitze, Kasten). Im Embryo zeigt sich zusätzlich eine Färbung epikardialer Zellen (Epi) und vereinzelt runde, p65-positive Zellen (Pfeil). Ein Zusammenhang der Expression oder Kernfärbung zur CytC-Färbung (CytC-negative Bereiche mit gestrichelter Umrandung) war im *cHccs*^{+/-}-Herzen weder embryonal noch neonatal auszumachen. IVS – Interventrikularseptum, VW – Ventrikelwand. Repräsentative Bilder, pro Gruppe n=4 untersuchte Herzen.

In der immunhistologischen Untersuchung kann sowohl die Expression von p65 in einzelnen Zellen und Zelltypen als auch die Aktivierung von NF κ B durch Translokation von p65 in den Kern untersucht werden. Hier zeigte sich im embryonalen und neonatalen Herzen eine deutliche p65-Expression im Endokard und dem Endothel größerer Gefäße, während sie in Kardiomyozyten verhältnismäßig gering war. Im neonatalen Myokard verstreut vorkommende einzelne p65-positive Zellen stellen wahrscheinlich auch größtenteils Kapillarendothel dar, auch wenn darüber ohne spezielle Anfärbung keine sichere Aussage gemacht werden kann. Im Embryo fiel zudem eine Anfärbung des Epikards und einzelne rundliche p65-positive Zellen auf, deren Identität unklar ist. Der größte Teil der p65-positiven Zellen wies dabei in beiden Altersgruppen eine zytoplasmatisch betonte Färbung auf. Eine augenscheinliche Assoziation zum Cytochrom-c-negativen Gewebe in *cHccs*^{+/-}-Herzen konnte weder in der zytoplasmatischen noch in der nukleären Anfärbung festgestellt werden (Abbildung 12C).

Durch Phosphorylation an Ser32 wird I κ B α , der Inhibitor von NF κ B, proteasomal abgebaut und NF κ B dadurch aktiviert (s. auch 1.2.3.3). Die Überprüfung dieser Phosphorylation von I κ B α an Ser32 zeigte im Westernblot weder in embryonalen noch in neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen eine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrolle. Gesamt-I κ B α war im Gegensatz dazu allerdings in zwei Untersuchungen im *Embryo* signifikant (*fc* 1,21 \pm 0,05, *p*=0,041, nicht abgebildet) bzw. hochsignifikant (*fc* 1,44 \pm 0,16, *p*=0,008; s. Abbildung 13A+C) heraufreguliert. Diese Heraufregulierung war in den vier Untersuchungen (gemischt biologische und technische Replikate) im *neonatalen* Herzen in der Tendenz immer vorhanden (*fc* von 1,12 bis 1,45). In einem Fall wurde statistische Signifikanz erreicht (*fc* 1,45 \pm 0,14, *p*=0,0213, nicht abgebildet).

Die Phosphorylierung von I κ B α entspricht zwar einer Inaktivierung, da sie zum Abbau des Proteins führt. Die Regulation von NF κ B wird letztendlich aber nicht primär von dieser Phosphorylierung, sondern durch den Gesamt-I κ B α -Level bestimmt. Daher weisen diese Daten zunächst auf eine mögliche Inhibierung der NF κ B-Aktivierung im *cHccs*^{+/-}-Herzen hin.

Bei teilweise signifikanten Untersuchungen im Westernblot sollte auch hier die Immunfluoreszenz-Untersuchung Aufschluss über mögliche Veränderungen in den einzelnen Zellgruppen geben. Die Kofärbung mit Cytochrom C zur Identifikation der HCCS-defizienten KO-Zellen im *cHccs*^{+/-}-Herzen wurde mit einem Primärantikörper auf Mausbasis durchgeführt. Bei Untersuchungen auf ein Zielprotein, dessen Antikörper

ebenfalls aus der Maus stammt, kann diese Kofärbung daher nicht durchgeführt werden. Hier wird auf einen Antikörper gegen das Chaperon *heat shock protein 60* (HSP-60) zurückgegriffen, das aus Kaninchen stammt. HSP-60 ist in embryonalen und neonatalen *Hccs*-KO-Kardiomyozyten angereichert und stellt somit einen etablierten Marker für diese Zellen dar¹¹⁰. Da der I κ B α -Antikörper in Mäusen generiert wird, wurde für die Immunfluoreszenz-Untersuchung von I κ B α mit HSP-60 gegengefärbt.

Die Untersuchung von I κ B α in der IF-Färbung ließ im embryonalen Herzen aufgrund eines schlechten Signal/Hintergrund-Verhältnisses keine sicheren Rückschlüsse auf eventuelle Unterschiede zwischen KO-Zellen und gesunden Zellen zu. In der Arbeitsgruppe bereits früher durchgeführte Untersuchungen im embryonalen *cHccs*^{+/-}-Herzen konnten allerdings eine Akkumulation von I κ B α in *Hccs*-KO-Kardiomyozyten nachweisen¹¹⁰. In den untersuchten neonatalen Herzen zeigte sich ein dementsprechender Befund: Hier bestand eine deutliche Korrelation zwischen HSP-60-positiven und I κ B α -positiven Zellen. I κ B α war allerdings vereinzelt auch in HSP-60-negativen Zellen detektierbar (s. Abbildung 13D). Auch in Kontroll-Herzen zeigte sich in manchen Arealen eine schwache HSP-60-Färbung, die mit verstärkter I κ B α -Färbung assoziiert war. Die Signalstärke beider Antikörper war dabei aber deutlich schwächer als im *cHccs*^{+/-}-Herzen (s. Abbildung 13E). HSP-60 zeigt zwar zuverlässig *Hccs*-KO-Zellen an¹¹⁰, ist aber als mitochondrialer Stressmarker nicht spezifisch für den KO. Die vorliegenden Bilder legen also nahe, dass I κ B α durch unterschiedliche Ursachen, unter anderem mitochondrialen Stress und damit auch den *cHccs*-KO, in neonatalen Kardiomyozyten heraufreguliert oder stabilisiert ist.

Zusammenfassend konnten die durchgeführten Untersuchungen keine Zunahme der Aktivität des NF κ B-Signalwegs durch Phosphorylierung von p65 an Ser536 und/oder nukleäre Translokation nachweisen. Vielmehr scheint es in den *Hccs*-KO-Zellen sowohl embryonal als auch neonatal zu einer Inhibition der Aktivität von NF κ B durch Induktion oder Stabilisierung von I κ B α zu kommen. Dies schlägt sich teilweise in einem signifikant erhöhtem I κ B α -Gesamtspiegel im Westernblot nieder.

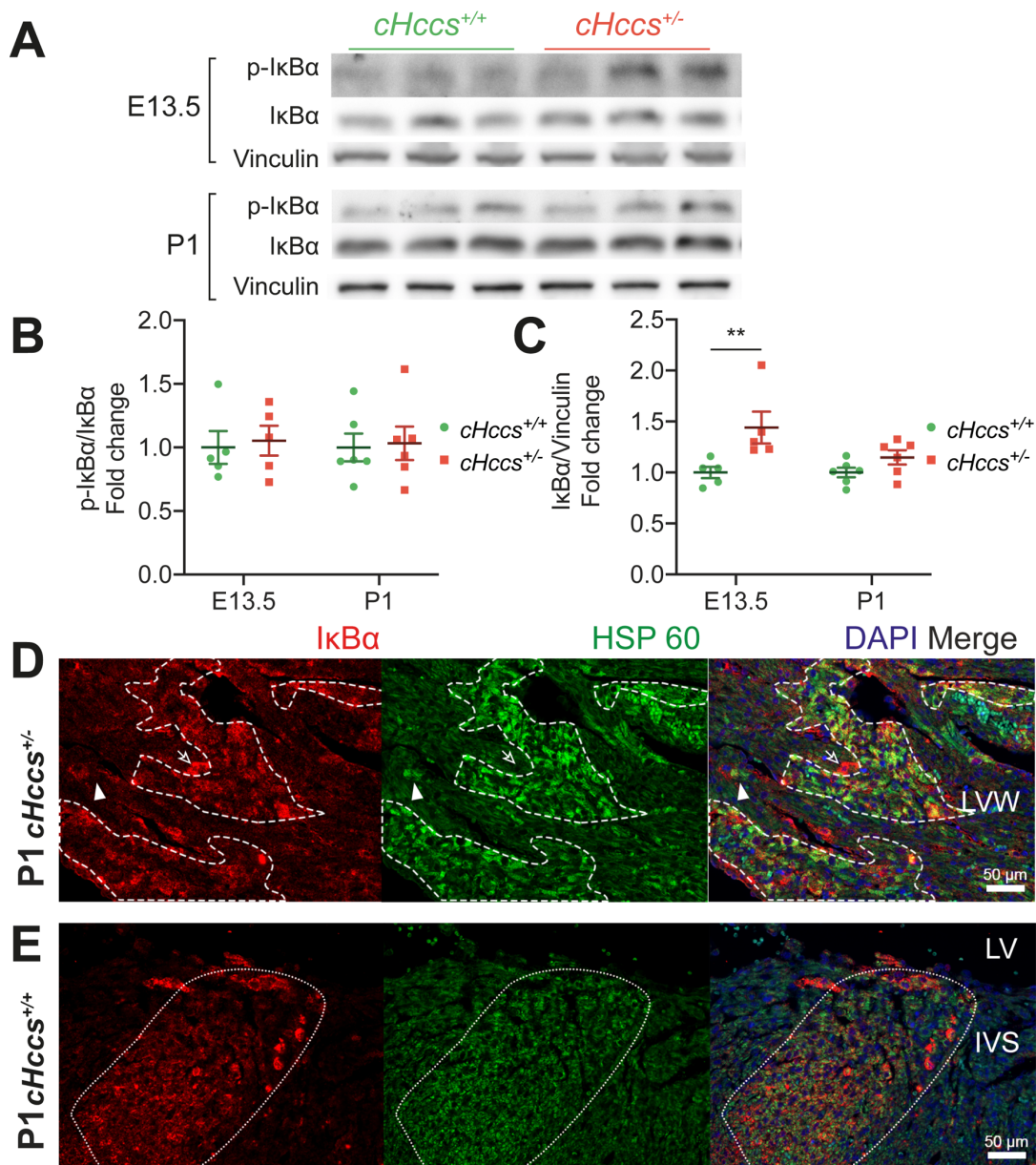


Abbildung 13: Der NFκB-Inhibitor IκBα ist in *Hccs*-KO-Zellen erhöht
A-C In der Westernblot-Analyse zeigte sich kein Einfluss des *cHccs*-KO auf die Phosphorylierung von IκBα im embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-} im Vergleich zu Kontrollherzen. Die Gesamtmenge des Inhibitors war allerdings in beiden Altersstufen in *cHccs*^{+/-}-Herzen erhöht, wenn auch nicht immer statistisch signifikant. *n*=5 embryonal, *n*=6 neonatal pro Gruppe **A** Beispielhafte Ausschnitte je eines WB mit Normalisierung auf Gesamt-IκBα (**B**) bzw. Vinculin (**C**), zur Signifikanz der Ergebnisse siehe Text. **D+E** In der Immunfluoreszenz-Untersuchung zeigte sich im neonatalen Herzen eine Korrelation zwischen der als KO-Marker dienenden HSP-60-Färbung und IκBα-Anfärbung (*n*=4 pro Gruppe, repräsentative Bilder) **D** Deutliche Korrelation zwischen HSP-60- (gestrichelt umrandete Bereiche) und IκBα-Anfärbung im heterozygoten *cHccs*-KO-Herzen, es finden sich aber auch IκBα-positive Zellen ohne HSP-60-Signal (Pfeil) und umgekehrt (Pfeilspitze). LVW – linke Ventrikelwand **E** Die Assoziation zwischen HSP-60 und IκBα ist nicht *cHccs*-KO-spezifisch, sondern tritt auch im Kontrollherzen, hier mit schwächerem HSP- und IκBα-Signal auf (gepunktet umrandeter Bereich). IVS – Interventrikularseptum, LV – linker Ventrikel. Repräsentative Bilder, *n*=3 pro Gruppe.

3.2.3 Zytokin-Level im *cHccs*^{+/-}-Herzen formell ohne signifikante Veränderung

Seneszente Zellen zeichnen sich durch einen sekretorischen Phänotyp aus, der auto- und parakrine, kontextabhängig sehr unterschiedliche Effekte ausübt. So kann der SASP

u.a. sowohl parakrin Proliferation hemmen als auch Tumorinvasivität fördern, durch Immunclearance Fibrose und Tumorwachstum verhindern als auch im Alter zu chronischen Entzündungszuständen führen (s. 1.2.2). Die Zusammensetzung des SASP aus verschiedensten Botenstoffen variiert ebenfalls stark kontextabhängig^{58,112}. Häufige und daher auch als Marker verwendete Zytokine des SASP sind vor allem die Interleukine IL-1 α/β und IL-6 und das Chemokin IL-8¹¹² (s. 1.2.3.5).

Um die Regulation inflammatorischer Botenstoffe im Sinne eines SASP im *cHccs*^{+/-}-Herzen zu untersuchen, wurde die mRNA-Expression ausgewählter Zytokine (*Il1b* und *Il6*, für IL-1 β und IL-6 kodierende Gene) in der qPCR überprüft. Zudem führten wir als Screening-Untersuchung ein Zytokin-Antikörper-Array (R&D Systems® Proteome Profiler™ Mouse XL Cytokine Array Kit) durch, in dem die Proteinexpression von 111 Zytokinen in einer Gewebeprobe gemessen wird. Die Breite dieser Untersuchung sollte gewährleisten, dass viele mögliche SASP-Bestandteile erfasst werden können. Zusätzlich würden darin auch über den SASP hinausgehende inflammatorische Prozesse im *cHccs*^{+/-}-Herzen erfasst. Aufgrund der verzögerten Induktion des SASP, der einige Tage nach Induktion zellulärer Seneszenz auftritt¹¹², wurde das aufwändige Zytokin-Array nur mit neonatalen Herzen durchgeführt.

In den qPCR-Untersuchungen zeigte sich bei keinem der beiden untersuchten Zytokine im neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen eine signifikante Regulation, auch wenn beide in der Tendenz eine Induktion im Vergleich zu Kontrollen aufwiesen (*Il1b* *fc* 1,78 \pm 0,43, *p*=0,22; *Il6* *fc* 1,36 \pm 0,24, *p*=0,36, s. Abbildung 14). Im embryonalen Herzen gelang aufgrund der schwachen Expression der Zytokine keine verwertbare mRNA-Untersuchung.

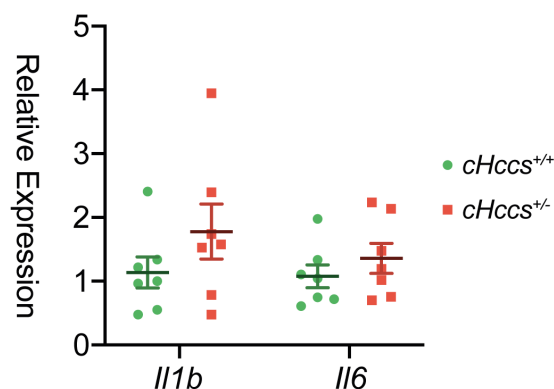


Abbildung 14: *Il1b* und *Il6* sind im neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen nicht signifikant reguliert
Zwei wichtige SASP-Zytokine weisen in der qPCR keinen signifikanten Unterschied in der RNA-Expression zwischen neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen und Kontrolle auf. *N*=7 pro Gruppe

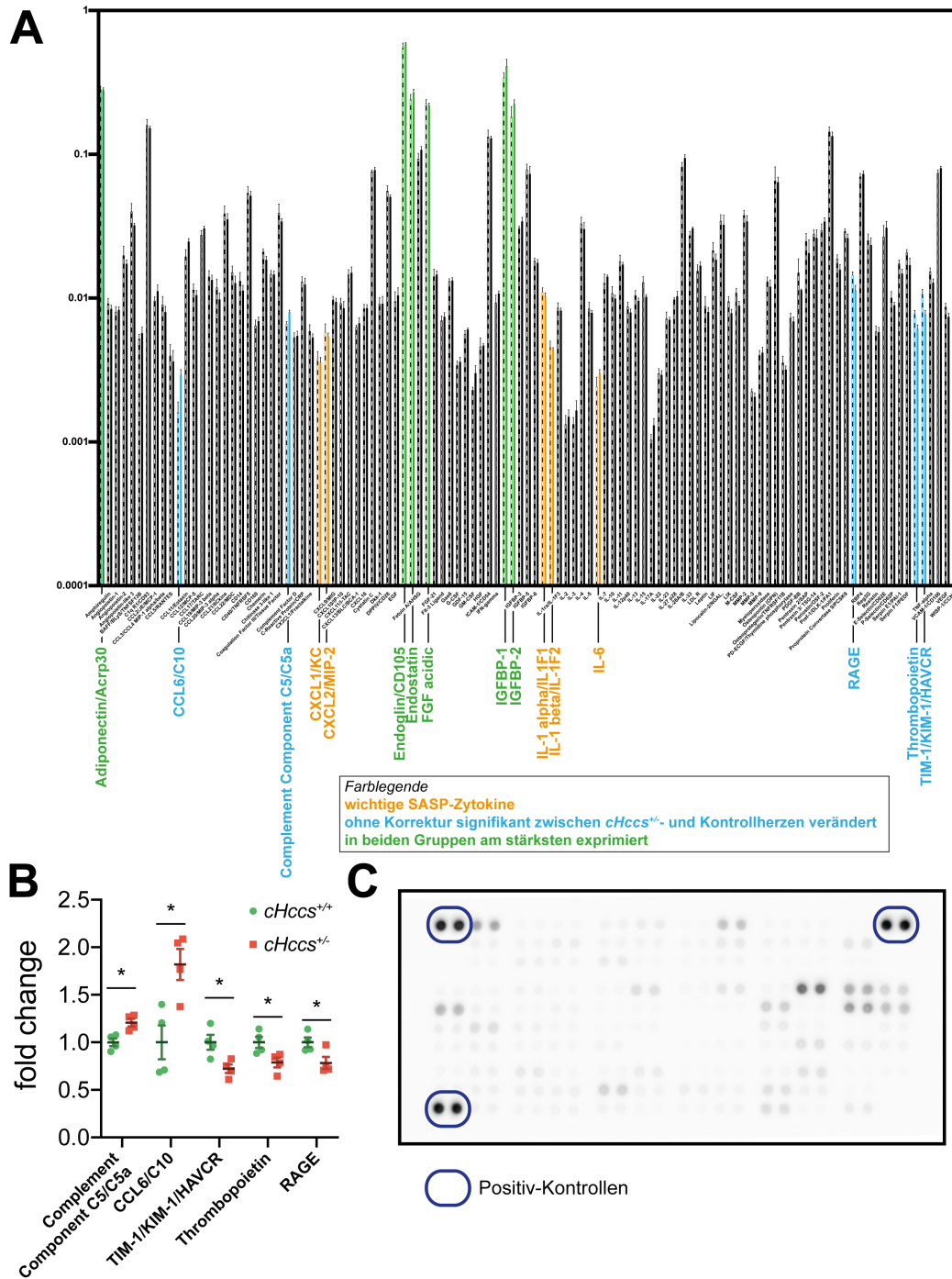


Abbildung 15: Im neonatalen $cHccs^{+/-}$ -Herzen ist keine vermehrte Zytokin-Expression im Vergleich zu Kontrollen nachweisbar

Auch im Antikörper-Array zeigte sich (nach Korrektur für multiples Testen) keine Veränderung der Zytokin-Expression auf Proteinebene zwischen neonatalen $cHccs^{+/-}$ - und Kontroll-Herzen. **A** Graphische Darstellung der Zytokinlevel, 1 entspricht dem densitometrischen Mittelwert der Positivkontrollen (in **C** umrandet). Man beachte die logarithmische Skalierung der Ordinate. Hervorgehoben sind die fünf wichtigsten SASP-Zytokine im Antikörper-Array (orange), ohne Korrektur signifikant zwischen $cHccs^{+/-}$ - und Kontrollherzen veränderte (blau) und die in beiden Gruppen im neonatalen Herzen am stärksten exprimierten Zytokine (grün). **B** Die ohne Korrektur signifikant zwischen $cHccs^{+/-}$ - und Kontrolle veränderten Zytokine des Zytokin-Arrays (blau in **A**) normalisiert auf die Kontrollgruppe und mit einzelnen Datenpunkten dargestellt **C** zeigt exemplarisch das Bild eines vom Imager aufgenommenen Zytokinarrays. Zwei nebeneinanderliegende Punkte entsprechen dem gleichen Protein. $n=4$ pro Gruppe.

Auch im Zytokin-Array (vollständiger Datensatz siehe Anhang) war nach statistischer Auswertung – inklusive Korrektur für multiples Testen – keine signifikante Regulation der Zytokin-Expression zwischen neonatalen *cHccs*^{+/-}- und Kontrollherzen feststellbar. Tabelle 7 stellt dies beispielhaft für wichtige SASP-Zytokine dar (in Abbildung 15A orange dargestellt):

Tabelle 17: Wichtige Zytokine des SASP sind im Zytokin-Array des neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert

Relative Veränderung (fold change) der im Zytokin-Array densitometrisch gemessenen Zytokin-Konzentration in neonatalen cHccs^{+/-}- und Kontrollherzen nach Normalisierung auf die Kontrollgruppe. Der q-Wert resultiert aus der Korrektur für multiples Testen und ist analog zum p-Wert zu verstehen (s. 2.2.7). n=4 pro Gruppe.

Zytokin	fold change <i>cHccs</i> ^{+/+}	fold change <i>cHccs</i> ^{+/-}	p-Wert	q-Wert
IL-1 alpha	1±0,074	0,927±0,059	0,472569	0,873183
IL-1 beta	1±0,093	0,956±0,031	0,670087	0,873183
IL-6	1±0,168	1,237±0,082	0,252393	0,873183
CXCL-1	1±0,129	0,950±0,074	0,745575	0,896487
CXCL-2	1±0,143	0,933±0,055	0,677455	0,873183

Die Korrektur für multiples Testen hat aufgrund der großen Anzahl an durchgeführten Tests einen starken Einfluss auf die Signifikanztestung (s. 2.2.7). Ohne Korrektur - also nur mit jeweils unabhängig durchgeführtem t-Test zwischen *cHccs*^{+/-} und Kontrolle für jedes einzelne Zytokin - waren fünf Zytokin-Spiegel signifikant verändert messbar (s. Abbildung 15B, in Abbildung 15A zur Einordnung blau dargestellt):

Tabelle 18: Im neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen signifikant veränderte Zytokine bei Verzicht auf die Korrektur für multiples Testen

Relative Veränderung der im Zytokin-Array densitometrisch gemessenen Zytokin-Konzentration in neonatalen cHccs^{+/-}- und Kontrollherzen nach Normalisierung auf die Kontrollgruppe. n=4 pro Gruppe.

Zytokin	fold change <i>cHccs</i> ^{+/+}	fold change <i>cHccs</i> ^{+/-}	p-Wert
Complement Component C5/C5a	1±0,041	1,208±0,040	0,011
CCL6/C10	1±0,179	1,819±0,163	0,015
TIM-1/KIM-1/HAVCR	1±0,077	0,7228±0,046	0,021
Thrombopoietin	1±0,059	0,7877±0,051	0,035
RAGE	1±0,051	0,7833±0,064	0,038

Unabhängig von den nicht vorhandenen Gruppenunterschieden bestanden große Unterschiede im Basis-Expressionslevel der untersuchten Zytokine im neonatalen Mausherzen. Die am stärksten exprimierten Zytokine listet Tabelle 19 auf (in Abbildung 15A grün dargestellt). Ihre verhältnismäßig starke Expression im neonatalen Herzen lässt auf eine Funktion dieser Zytokine in der Anpassung des neonatalen Myokards nach Geburt schließen. In dieser Zeit verändert das neonatale Myokard sowohl sein Wachstum (Hyperplasie zu Hypertrophie⁸⁶), seinen Metabolismus (Glykolyse zu Fettsäureoxidation¹⁷⁰) und muss sich an veränderte extraterine Bedingungen anpassen.

Tabelle 19: Die im Zytokinarray des neonatalen Mausherzen am stärksten exprimierten Zytokine
Relative Veränderung der im Zytokin-Array densitometrisch gemessenen Zytokin-Konzentration in neonatalen cHccs^{+/-}- und Kontrollherzen nach Normalisierung auf den Mittelwert der Positivkontrollen. Der q-Wert resultiert aus der Korrektur für multiples Testen und ist analog zum p-Wert zu verstehen (s. 2.2.7). n=4 pro Gruppe.

Zytokin	fold change cHccs ^{+/+}	fold change cHccs ^{+/-}	p-Wert	q-Wert
Endoglin/CD105	0,554±0,04	0,587±0,012	0,456	0,873
IGFBP-1	0,342±0,028	0,411±0,046	0,249	0,873
Adiponectin/Acrp30	0,283±0,016	0,28±0,01	0,879	0,954
Endostatin	0,242±0,02	0,269±0,015	0,31	0,873
FGF acidic	0,226±0,015	0,218±0,009	0,665	0,873
IGFBP-2	0,182±0,033	0,224±0,016	0,297	0,873

3.2.4 Anzeichen für eine Aktivierung von STAT3 in HCCS-defizienten Kardiomyozyten

IL-6, eines der prominentesten Zytokine des SASP, vermittelt seine proinflammatorischen Effekte vor allem über den JAK/STAT-Signalweg⁹¹. Bei den Januskinasen (JAK) handelt es sich um eine Gruppe von vier Tyrosinkinasen [JAK1, JAK2, JAK3 und Tyrosinkinase 2 (TYK2)]. JAK1 und 2 sind Teil der inflammatorischen Signalübertragung und Vermittler endo- und parakriner Signale, während JAK3 und TYK2 an der Bildung und Funktion von Immunzellen beteiligt sind¹⁸⁸. Nach Bindung von IL-6 an seinen Rezeptorkomplex kommt es zur Dimerisierung und Autophosphorylierung von JAK und zur Phosphorylierung unterschiedlicher Zielproteine, unter anderem *signal transducer and activator of transcription*(STAT) 1 und STAT3. STAT3 wird dabei an Tyr705, STAT1 an Tyr701 phosphoryliert. Es kommt daraufhin zu Homo- und Heterodimerisierung von STAT1 und STAT3, Translokation in den Zellkern, DNA-Bindung und konsekutiver Transkription entsprechender inflammatorischer Zielgene. Die Rolle von STAT3 ist dabei vielfältig und erstreckt sich von der Regulation der Zelldifferenzierung über Zelltod hin zu Proliferation und Zellüberleben⁹¹. Im Herzen nimmt STAT3 auf alle wesentlichen Zelltypen im Myokard (Kardiomyozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Immunzellen) Einfluss und reguliert auch hier Differenzierung, Proliferation und Zellüberleben⁶².

Im Kontext dieser Arbeit sind vor allem Untersuchungen relevant, die einen Einfluss des JAK/STAT-Signalwegs auf den SASP, zelluläre Seneszenz und kardiale Regeneration belegen: So kann exogenes IL-6 über JAK/STAT in Fibroblasten Seneszenz und damit den SASP induzieren. Das dann von diesen Zellen sezernierte IL-6 verstärkt diesen Effekt im Sinne einer positiven Feedback-Schleife⁹¹. Die Inhibition von

JAK1/2 in humanen Nabelschnurepithelzellen und Präadipozyten unterdrückt wiederum den SASP¹⁸⁸. Entsprechend der vielseitigen, kontextabhängigen Funktion von STAT3 ist seine Rolle auch in seneszenten Zellen vor allem in Abhängigkeit vom Zelltyp sehr heterogen. So konnte eine Seneszenz inhibierende und damit Tumorwachstum fördernde Funktion in prämaligen Zellen und Tumorzellsystemen nachgewiesen werden⁹¹. Unabhängig von zellulärer Seneszenz scheint JAK/STAT auch für Myokard-Regeneration relevant zu sein. Sowohl in einem Zebrafisch-Modell kardialer Regeneration nach chirurgischer Apex-Resektion als auch in der regenerativen Antwort in einem murinen Myokarditis-Modell konnte eine wesentliche Rolle von JAK/STAT-Signalen für die kardiale Regeneration nachgewiesen werden^{54,124}. Aufgrund der tragenden Rolle als IL-6-Effektorsignalweg, seiner Funktion in der Regulation des SASP und seinem Einfluss auf kardiale Regeneration wurde JAK/STAT im *cHccs*^{+/-}-Herz auf seine Aktivität untersucht. Obwohl IL-6 selbst keine signifikante Änderung in den qPCR-Untersuchungen und im Zytokin-Array (s. 3.2.3) aufwies, könnte durch den verstärkenden Effekt von Signalkaskaden möglicherweise ein schwacher Effekt von IL-6 anhand einer Induktion seiner Downstream-Targets nachgewiesen werden. Insbesondere konnte durch die Immunfluoreszenz-Untersuchung des JAK-STAT-Signalwegs auch ein Effekt auf bestimmte Zelltypen (wie *Hccs*-KO-Kardiomyozyten) untersucht werden. Dies war für IL-6 in der qPCR und dem Zytokin-Array nicht möglich, da hier RNA und Proteine aus dem gesamten Herzen untersucht wurden.

Die Proteinanalyse im Westernblot (Abbildung 16A) konnte in technisch und biologisch wiederholten Untersuchungen weder im embryonalen noch im neonatalen Herzen einen statistisch signifikanten Unterschied in der STAT3-Aktivierung durch Phosphorylierung an Tyr705 (p-STAT3) im *cHccs*^{+/-}-Herzen im Vergleich zur Kontrolle nachweisen.

An Tyr701 phosphoryliertes STAT1 (p-STAT1) konnte im Westernblot weder in embryonalen noch neonatalen Herzen detektiert werden. Allerdings zeigte sich ein tendenziell erhöhter Spiegel von Gesamt-STAT1 in *cHccs*^{+/-}-Herzen im Vergleich zur Kontrolle in beiden Entwicklungsstadien (Abbildung 16A). Dieser Unterschied war nur schwach und nicht statistisch signifikant (embryonal: *fc* 1,31±0,06, *p*=0,053, neonatal: *fc* 1,21±0,02, *p*=0,063). Erwähnenswert sind diese Daten aber aufgrund der Beteiligung von Gesamt-STAT1 an Interferon-Signalwegen, auf die in der Diskussion noch eingegangen werden soll (s. 4.2.4).

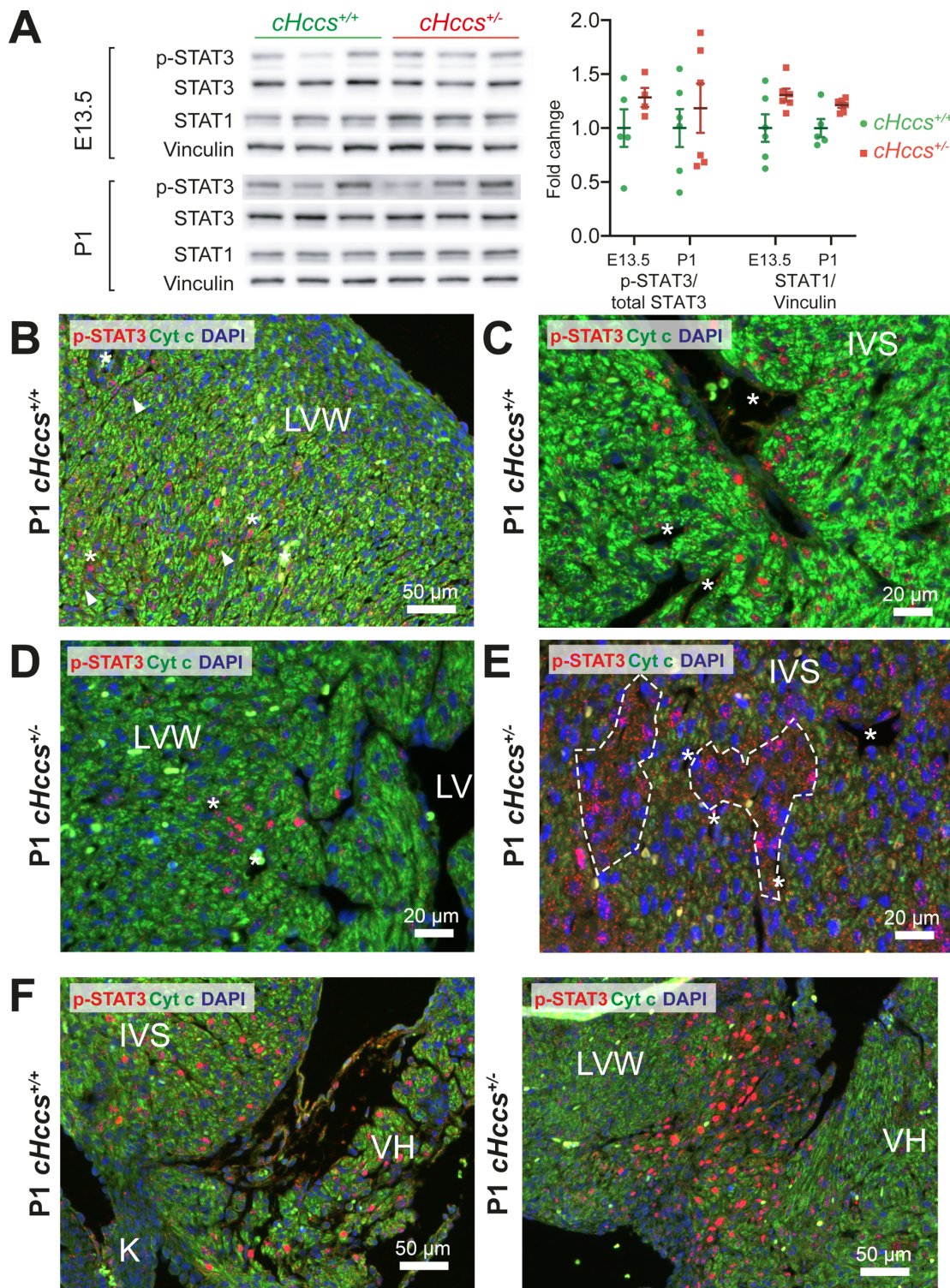


Abbildung 16: Der *Hccs*-KO bedingt in HCCS-defizienten Kardiomyozyten eine Aktivierung von STAT3, die aber auch davon unabhängig in *cHccs*^{-/-}- und Kontrollherzen auftritt

A Westernblotanalysen von *STAT3* und *STAT1* zeigten keinen Hinweis auf eine vermehrte Phosphorylierung von *STAT3* an Tyr705 (*p-STAT3*) im *cHccs*-KO-Modell und eine leichte, statistisch nicht signifikante Erhöhung des *STAT1*-Levels in embryonalen und neonatalen *cHccs*^{-/-}-Herzen im Vergleich zu Kontrollen. **B-D** In der Immunfluoreszenzfärbung neonataler Herzen zeigten sich kleine Cluster *p-STAT3*-positiver Kerne im Myokard. Diese waren sowohl in Kontroll- (**B+C**) als auch *cHccs*^{-/-}-Herzen (**D**) anzutreffen. Dabei traten sie häufig in Gefäßnähe auf (Gefäßlumina mit Sternchen markiert). **B** Mehrere *p-STAT3*-positive Cluster (Pfeilspitze) in der freien Wand eines Kontrollherzens **C** Die Cluster traten vor allem in der Nähe großer Gefäße auf **D** *p-STAT3*-Cluster im gesunden Myokard eines *cHccs*^{-/-}-Herzens. **E** In neonatalen *cHccs*^{-/-}-Herzen zeigte sich ein im Vergleich zum umliegenden Gewebe verstärktes *p-STAT3*-

Signal in den Kernen Cyt-c-negativer Areale (umrandete Bereiche). Im Vergleich zu den p-STAT3-positiven Clustern war die p-STAT3-Färbung hier schwächer. Zur besseren Sichtbarkeit wurde das Signal des roten Farbkanals in dieser Abbildung digital verstärkt, ein Vergleich mit B-D ist somit nicht direkt möglich. F Unabhängig vom cHccs-KO waren stark p-STAT3-positive Kerne am atrioventrikulären Übergang und in den Vorhöfen aufzufinden. n=4 pro Gruppe. IVS – interventrikuläres Septum, K – Klappe, LV – Linker Ventrikel, LVW – linksventrikuläre freie Wand, VH – Vorhof

p-STAT1 konnte in neonatalen Herzen analog zum Westernblot auch immunhistologisch nicht nachgewiesen werden. Die auffälligen Ergebnisse der Gesamt-STAT1-Analyse konnten aufgrund methodischer Untauglichkeit des Antikörpers für Immunfluoreszenz-Analysen in Paraffin-eingebettetem Gewebe (Herstellerangaben¹⁶⁴) hier noch nicht weiter untersucht werden.

Die immunhistologische Untersuchung auf p-STAT3 im Herzgewebe des cHccs-KO wurde nur am neonatalen Herzen durchgeführt. Als Zufallsbefund fielen sowohl in cHccs^{+/-}- als auch Kontrollherzen in den Vorhöfen und im Bereich des atrioventrikulären Übergangs (AV-Übergang) deutlich p-STAT3-positive Kerne auf (Abbildung 16F).

Es zeigten sich darüber hinaus zunächst sowohl in neonatalen cHccs^{+/-}- als auch in Kontrollherzen kleine Cluster p-STAT3-positiver Zellkerne (p-STAT3-Cluster) im Myokard (Abbildung 16B-D). Die Signalintensität dieser Cluster war im Vergleich zum schwachen p-STAT3-Signal der Kerne des restlichen Myokards verstärkt, aber wiederum schwächer als der beschriebene Befund am AV-Übergang. Sowohl in Kontroll- als auch cHccs^{+/-}-Herzen traten die p-STAT3-Cluster gehäuft in der Nähe von Gefäßen auf (Abbildung 16C). In cHccs^{+/-}-Herzen traten die p-STAT3-Cluster auch in Cytochrom-c-positiven, also gesundem Myokard auf (Abbildung 16D).

Allerdings fand sich – in der qualitativen Beurteilung – in den Cytochrom-c-negativen Bereichen ein zum umliegenden Gewebe verstärktes p-STAT3-Signal (Abbildung 16E). Leider waren nur in zwei der vier untersuchten cHccs^{+/-}-Herzen mit ausreichender Sicherheit Cytochrom-C-defiziente Bereiche abgrenzbar. Dies schränkt die Aussagekraft der Untersuchung zwar ein, die vorliegenden qualitativen Ergebnisse deuten dennoch darauf hin, dass der Hccs-KO zu einer STAT3-Aktivierung in den betroffenen Arealen des neonatalen cHccs^{+/-}-Herzens führt.

3.2.5 Interferon- γ und Interferon-stimulierte-Gene sind im neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen stimuliert

In bereits zuvor in der Arbeitsgruppe durchgeführten genomweiten-RNA-Microarray-Untersuchungen wurde das Transkriptom embryonaler und neonataler *cHccs*^{+/-}-Herzen auf Veränderungen der Genexpression hin untersucht (embryonale Herzen veröffentlicht von Magarin et al.¹¹¹, Daten der neonatalen Herzen unveröffentlicht). Dabei zeigte sich in neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen eine Heraufregulation mehrerer Interferon(IFN)-stimulierter Gene (siehe Tabelle 20). Interferone sind eine Gruppe von wichtigen Signalproteinen der Immunantwort. Sie haben zentrale Bedeutung in der Reaktion auf virale Erreger, besitzen aber auch immunmodulatorische und antiproliferative Eigenschaften. Anhand ihrer Signalwege werden sie in verschiedene Gruppen eingeteilt, prominenteste Vertreter der sogenannten Typ-I-IFN-Antwort sind IFN α und β , IFN γ wiederum ist das IFN der IFN-II-Antwort. Zur detaillierten Beschreibung der IFN-Antwort sei auf entsprechende Reviews verwiesen, da diese den vorgegebenen Rahmen sprengen würde^{39,171}.

Die Themengebiete Interferonantwort, Inflammation und SASP weisen hinsichtlich der beteiligten Signalwege einige Schnittmengen auf. So sind sowohl Typ-I- als auch Typ-II-IFN-Antwort im Zusammenhang mit zellulärer Seneszenz beschrieben; sie können Seneszenz auslösen und werden von seneszenten Zellen induziert^{40,90,182,196}. Zudem sind auch wichtige SASP-Elemente wie p38, NF κ B und der JAK/STAT-Signalweg an der IFN-Antwort beteiligt^{39,171}. Aufgrund dieser Schnittmengen wurden die genannten Vorergebnisse der Arbeitsgruppe im Rahmen dieser Arbeit nachverfolgt.

Tabelle 20: Statistisch signifikant induzierte Interferon-stimulierte Gene im neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen, *fold change* in Bezug auf *cHccs*^{+/+}-Kontrollen

Name	Beschreibung	<i>fold change</i>	q-Wert nach FDR-Korrektur
<i>Ifit1</i>	<i>interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1</i>	13,4276	0,0000119
<i>Ifi202b</i>	<i>interferon activated gene 202B</i>	4,25788	0,00155211
<i>Ifit3</i>	<i>interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3</i>	3,95104	0,000202379
<i>ligp1</i>	<i>interferon inducible GTPase 1</i>	2,5186	0,0000752
<i>Ifrd1</i>	<i>interferon-related developmental regulator 1</i>	1,40569	0,000934054
<i>Ifnar2</i>	<i>interferon (alpha and beta) receptor 2</i>	1,26903	0,00107213
<i>Isg2011</i>	<i>interferon stimulated exonuclease gene 20-like 1</i>	1,26372	0,0344668

Von den >1,5-fach heraufregulierten Genen sind *Ifit1*, *Ifit3* und *ligp1* als Teil der IFN-vermittelten Pathogenabwehr bekannt. Die korrespondierenden Proteine IFIT1 und IFIT3 erkennen Virus-RNA anhand der fehlenden 5'-Cap und sequestrierten diese²⁹. Sie werden

durch die Interferon-I-Antwort, also IFN α und β induziert⁷⁹. IIGP1 hingegen wird primär von IFN γ induziert¹⁷⁶, seine genaue Funktion ist noch relativ unerforscht. Es spielt aber ebenfalls eine Rolle in der Pathogen-Abwehr - so vermittelt der Knockout in der Maus eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Toxoplasmen¹⁰⁴. Die Ursache für die Induktion dieser Gene im *cHccs*^{+/-}-Herzen ist dementsprechend zunächst nicht eindeutig einzuordnen.

Die Funktion von p202, dem von *Ifi202b* kodierten Protein, ist im Vergleich bereits weitergehend untersucht. Es gehört zur p200-Familie, einer Gruppe von sechs murinen Proteinen mit einer einzigartigen Sequenz von 200 Aminosäuren, zu denen drei homologe humane Varianten bekannt sind. Die p200-Proteine sind in Wachstumsregulation, Differenzierung und auch Zellzyklusinhibition involviert und werden von Typ-I und -II-IFN induziert. Bei *Ifi202b* handelt es sich um eine Spleißvariante von *Ifi202*. *Ifi202* wird unter anderem im Herz und Muskel während der Organentwicklung exprimiert und trägt zur Differenzierung von Myoblasten bei. Zudem sind zahlreiche Interaktionen mit p53 und p21 belegt, durch die p202 Einfluss auf Zellzyklusinhibition und Apoptose ausübt und einen seneszenten Phänotyp auslösen kann. Neben der Induktion durch Interferone sind davon unabhängige Induktionsmechanismen bekannt⁵.

Die Ergebnisse der vorangegangenen Microarray-Untersuchung sollten hier zunächst durch qPCR-Analysen der entsprechenden Gene in embryonalen und neonatalen, hier zusätzlich auch in drei Wochen alten (P21) Herzen untersucht werden. Geeignete Primer konnten nur für *Ifit1* und *Ifit3* optimiert werden, *Iigp1* und *Ifi202b* konnten somit nicht untersucht werden. Die qPCR-Analyse von *Ifit1* und *Ifit3* bestätigte die Induktion der beiden Gene im neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen. Bei *Ifit1* fand sich eine relative Expression von $4,04 \pm 0,93$ ($p < 0,01$), *Ifit3* war $3,14 \pm 0,6$ -fach heraufreguliert ($p = 0,012$). Im embryonalen Herzen zeigte sich keine signifikante Induktion der beiden Gene, während die Induktion auch im drei Wochen alten Herzen nachgewiesen werden konnte – wenn auch mit geringerem Effekt (*Ifit1*: fc $1,42 \pm 0,17$, $p = 0,047$; *Ifit3*: fc $1,61 \pm 0,13$, $p < 0,01$) (s. Abbildung 17A). Die Abnahme der Expression könnte neben einer tatsächlich schwächeren Induktion auch im Mengenverhältnis zwischen KO-Zellen und gesunden Zellen begründet sein, da die kompensatorische Hypertrophie der gesunden Zellen im postnatalen Verlauf zu einer relativen Zunahme der gesunden Zellmasse führt⁴⁷.

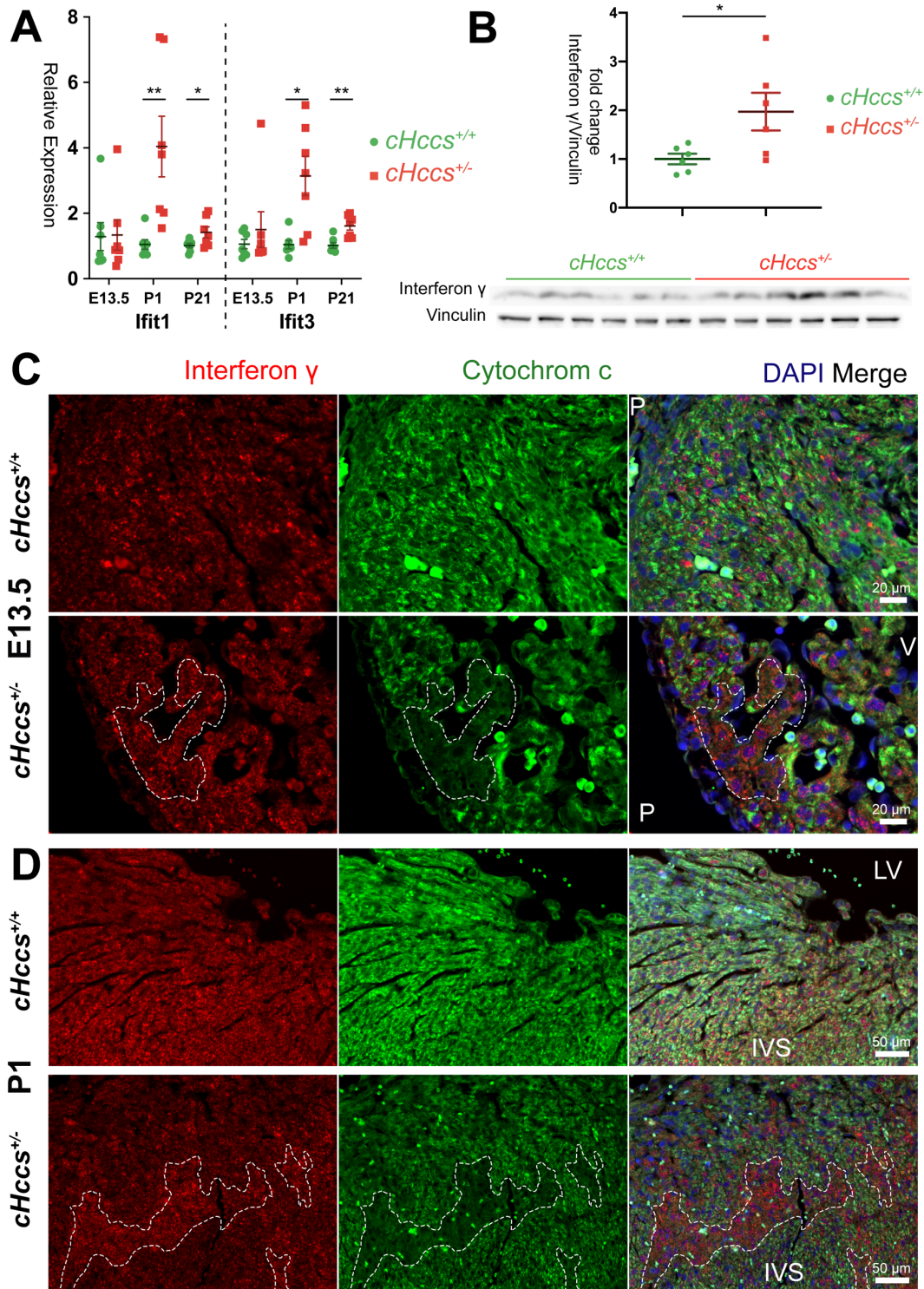


Abbildung 17: In HCCS-defizienten Zellen des neonatalen $cHccs^{+/-}$ -Herzens ist Interferon γ , im neonatalen $cHccs^{+/-}$ -Herzen Interferon-stimulierte Gene induziert

A Die Induktion Interferon-stimulierter Gene konnte für *Ifit1* und *Ifit3* in neonatalen und drei Wochen alten, nicht jedoch in embryonalen $cHccs^{+/-}$ -Herzen nachgewiesen werden (qPCR-Daten, $n=7$ pro Gruppe). **B** Im Westernblot war Interferon γ in neonatalen $cHccs^{+/-}$ -Herzen im Vergleich zu Kontrollen verstärkt nachweisbar. $n=6$ pro Gruppe **C** In der Immunfluoreszenzfärbung konnte im E13.5-Herzen kein Unterschied in der IFN- γ -Färbung zwischen Kontrollen und $cHccs^{+/-}$ -Herzen oder zwischen gesunden und HCCS-defizienten Kardiomyozyten (umrandeter Bereich) festgestellt werden. $n=4$ pro Gruppe **D** Im P1-Herzen zeigte sich eine Kolokalisation der Interferon- γ -Expression mit Cytochrom-c-negativen Zellen (beispielhaft umrandete Bereiche). $n=4$ pro Gruppe. IVS – interventrikuläres Septum, LV – linker Ventrikel, P – Perikard, V - Ventrikel

Da IFN- γ zelluläre Seneszenz induzieren kann^{90,182}, wurde hier zunächst dessen Expression in neonatalen Herzen im Westernblot untersucht. Hier zeigte sich in einem Westernblot eine signifikante Heraufregulierung in neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen um das 1,97±0,39-fache (p=0,036) im Vergleich zu Kontrollen. Im Zytokinarray konnte allerdings kein signifikanter Unterschied in der IFN- γ -Expression zwischen Kontrolle und *cHccs*^{+/-}-Gruppe festgestellt werden (*fc* 1,16±0,05, p-Wert=0,31, q-Wert=0,87, siehe 3.2.3). In der Westernblot-Untersuchung embryonaler Herzen konnte keine Interferon- γ -Bande detektiert werden. Aufgrund der auffälligen Daten aus dem Westernblot wurde das Expressionsmuster von IFN- γ immunhistologisch untersucht. Dort zeigte sich in neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen eine schwache Kolo-kalisation der IFN- γ -Färbung mit CytC-negativen Zellen (s. Abbildung 17D). Im embryonalen *cHccs*^{+/-}-Herzen zeigte sich dieser Unterschied nicht (s. Abbildung 17C). Die verstärkte Anfärbung der CytC-negativen Bereiche stellt sich flächig dar und ist keinem Zellkompartiment zuzuordnen. Sie ist auch insofern bemerkenswert, als dass IFN- γ im Herzen soweit bekannt nicht durch Kardiomyozyten, sondern von Zellen des Immunsystems synthetisiert wird¹⁰¹. Ob diese verstärkte Anfärbung also eine IFN- γ -Synthese in Kardiomyozyten darstellt, an einen Rezeptor gebundenes IFN- γ detektiert oder eine andere Ursache hat, ist unklar.

Zusammengefasst konnte hier die transkriptionelle Induktion der beiden Interferon-regulierten Gene *Ifit1* und *Ifit3* in neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen bestätigt werden. IFN- γ wurde im Westernblot – im Gegensatz zum Zytokin-Array – im neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen verstärkt nachgewiesen und ist in der Histologie mit den HCCS-defizienten-Zellen assoziiert.

3.3 Die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase

3.3.1 SABG lässt sich im *cHccs*^{+/-}-Herzen nicht nachweisen

Bei zellulärer Seneszenz akkumuliert aus bisher noch unzureichend geklärten Ursachen eine spezielle Variante des lysosomalen Enzyms β -Galaktosidase (s. 2.2.6.3). Da der genaue Zusammenhang der Akkumulation mit den Signalwegen zellulärer Seneszenz unbekannt ist, steht sie im Schema der Signalwege (s. Abbildung 3) gesondert. Man nimmt einen Zusammenhang mit dem vermehrten Auftreten von Lysosomen in seneszenten Zellen an. SABG ist ein etablierter Marker von zellulärer Seneszenz *in vivo* und *in vitro*^{41,45,78}. Er wurde bereits in Untersuchungen von embryonalem Gewebe und auch embryonalem Herzgewebe verwendet, um zelluläre Seneszenz nachzuweisen^{109,126}. Das Auftreten von SABG ist jedoch keine Voraussetzung für zelluläre Seneszenz.

Aufgrund seiner unzureichenden Spezifität und des unbekanntem Mechanismus seiner Anreicherung gilt – wie für alle Seneszenz-Marker – dass SABG im Kontext anderer Marker betrachtet werden sollte^{33,156}.

Die verwendete Färbetechnik (s. 2.2.6.3) wurde an verschiedenen Geweben (Niere, Lunge, Herz, Milz, Leber) in gealterten Mäusen (15-18 Monate) auf ihre Funktion getestet. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass die altersbedingte Seneszenz mit Hilfe der SABG-Färbung detektiert werden kann. Im Nierengewebe zeigten sich deutlich positiv (blau) gefärbte Zellen (s. Abbildung 18C), alle anderen Gewebe waren negativ für SABG-Färbung. Die Nierenfärbung entspricht dem Literaturbefund: Nierengewebe enthält im Alter viele SABG-positive Zellen¹²¹.

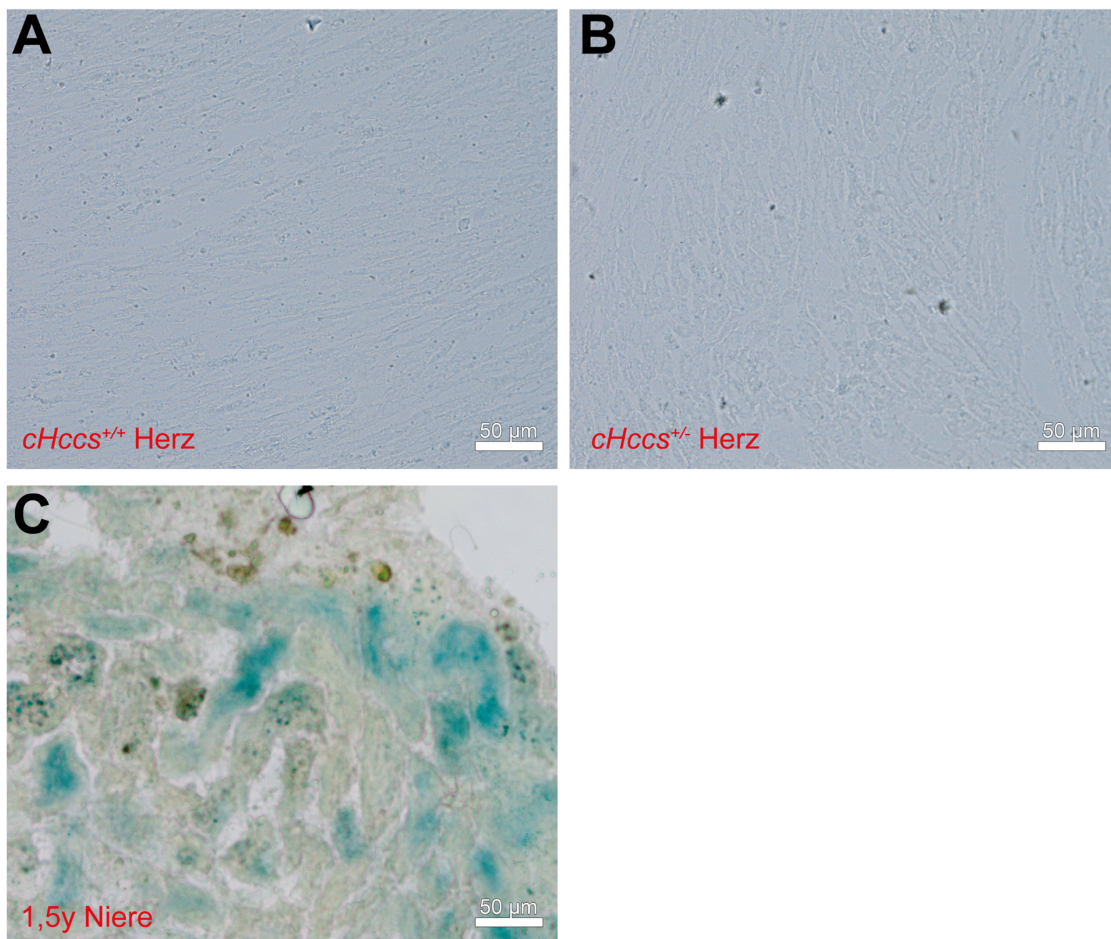


Abbildung 18: Kein Nachweis von Seneszenz-assoziiertes β -Galaktosidase in fünf Tage alten $cHccs^{+/-}$ -Herzen

Der Seneszenz-Marker SABG konnte in $cHccs^{+/-}$ -Herzen (A, n=1) und $cHccs^{+/+}$ -Kontrollen (B, n=4) nicht nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu die Positiv-Kontrolle einer ca. anderthalb Jahre alten Mäuseniere mit deutlich blau gefärbten Arealen (C). Hellfeldmikroskopie-Aufnahmen ohne Phasenkontrast.

Die Untersuchung am Herzgewebe fand mit fünf Tage alten Mäusen statt, da kein frisches P1-Gewebe für Kryoschnitte zur Verfügung stand. Wie erwartet waren in den

Schnitten der Kontrollgruppe keine Zellen blau angefärbt. Auch im einzigen untersuchten *cHccs*^{+/-}-Herzen waren keine SABG-positiven Zellen zu finden (s. Abbildung 18A+B). Da nur ein heterozygoten Herz für die Untersuchung zur Verfügung stand, kann dies allerdings nur exemplarisch die Aussage der Untersuchungen anderer Seneszenz-Marker unterstützen.

3.4 Zellzyklusinhibition

Wesentliches Merkmal der zellulären Seneszenz ist der Ausstieg aus dem Zellzyklus (s. 1.2.1). Dieser wird wesentlich durch die beiden Zellzyklusinhibitoren p16^{Ink4a} (p16) und p21^{Cip} (p21) vermittelt.

3.4.1 Der Zellzyklusinhibitor p21 ist im *cHccs*^{+/-}-Herzen induziert, aber unerwartet lokalisiert

p21 verhindert primär über die Inhibition der *cyclin-dependent kinase*(CDK) 2 die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb) und damit den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus (s. 1.2.3.2), kann aber auch andere CDKs inhibieren und den Zellzyklus auch am Übergang von der G2- in die M-Phase stoppen. Darüber hinaus kann es Zellproliferation auch durch die inaktivierende Bindung von PCNA, einem wichtigen Protein der DNA-Replikation, unterdrücken²². p21 ist vor allem als Vermittler der p53-Funktion bekannt, kann aber auch p53-unabhängig Seneszenz induzieren und Proliferation verhindern. So ist zum Beispiel die programmierte Seneszenz der embryonalen Entwicklung p53-unabhängig über p21 vermittelt^{126,167}.

p21 wurde in *cHccs*^{+/-}- und Kontrollherzen mittels qPCR, Westernblot und IF-Färbung untersucht. Die RNA-Expressionsanalyse des für p21 kodierenden Gens *Cdkn1a* in der qPCR zeigte eine signifikante Heraufregulation in *neonatalen cHccs*^{+/-}-Herzen um $1,93 \pm 0,39$ gegenüber der Kontrollgruppe ($p=0,038$). Sowohl in embryonalen als auch in drei Wochen alten Herzen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen, auch wenn sich die Tendenz einer Heraufregulation in *cHccs*^{+/-}-Herzen zeigte (E13.5: fc $1,4 \pm 0,17$, $p=0,094$; P21: fc $1,21 \pm 0,17$, $p=0,38$) (s. Abbildung 19B). Dabei unterscheiden sich diese Ergebnisse in embryonalen Herzen von vorangegangenen Untersuchungen von Hennig, bei denen eine hochsignifikante Heraufregulation von *Cdkn1a* gefunden wurde⁷¹. Im Westernblot zeigte sich in wiederholten Untersuchungen sowohl in E13.5- als auch in P1-Herzen eine hochsignifikante Heraufregulation der p21-Expression um das 2,87-fache (SEM $\pm 0,41$, $p=0,004$) bzw. 3,71-fache (SEM $\pm 0,67$, $p=0,004$) (s. Abbildung 19A). p21 scheint somit – unter Berücksichtigung der Daten von

Hennig – sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene im Herzen embryonaler und neonataler *cHccs*^{+/-}-Mäuse induziert zu sein.

In seiner klassischen Rolle als Zellzyklusinhibitor wäre eine Heraufregulation von p21 im *gesamten* Myokard des regenerierenden *cHccs*^{+/-}-Herzens vor allem embryonal wenig schlüssig, da dies der Regeneration widersprechen würde. Entsprechend der Arbeitshypothese, dass der *Hccs*-KO in den betroffenen Zellen zelluläre Seneszenz triggert, würde vielmehr eine isolierte Induktion und dadurch ausgelöste Zellzyklusinhibition der KO-Zellen logisch erscheinen. Eine verminderte Proliferation der HCCS-defizienten Zellen wurde von Drenckhahn et al. bereits nachgewiesen⁴⁷. Die Untersuchung mittels Immunfluoreszenzfärbung sollte darum Aufschluss über die genaue Lokalisation von p21 geben.

Die histologischen Untersuchungen zeigten im embryonalen *cHccs*^{+/-}-Herzen zunächst eine in ihrer Intensität heterogene *nukleäre* p21-Färbung der Kardiomyozyten. Diese nukleäre p21-Färbung war unabhängig von der Cytochrom-c-Anfärbung der Zellen und auch ohne qualitativen Unterschied zum Anfärbungsmuster der Kontrollen (s. Abbildung 19C und Anhang 2A). Das *nicht-nukleäre* p21-Signal war allerdings in Cytochrom-c-positiven-Bereichen im Vergleich zu den Cytochrom-c-defizienten Arealen leicht verstärkt (s. Abbildung 19C). Auch im neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen fand sich das gleiche Muster (s. Abbildung 19D). Hier war der Unterschied des *nicht-nukleären* p21-Signals zwischen Cytochrom-c-positiven und -defizienten Bereichen verglichen mit dem embryonalen *cHccs*^{+/-}-Herzen zudem deutlicher erkennbar. Dies hängt zumindest teilweise wohl mit dem im Vergleich zum embryonalen Herzen veränderten Kern-Zytoplasma-Verhältnis im neonatalen Herzen zusammen, das den zytoplasmatischen Raum deutlicher zur Darstellung kommen lässt. In neonatalen *cHccs*^{+/-}- und Kontrollherzen zeigte sich sonst ebenfalls ein heterogenes Kernfärbungsmuster unterschiedlicher Intensität, vereinzelt traten hier sowohl in gesunden als auch in Cytochrom-c-defizienten Arealen deutlich p21-positive Kerne auf (s. Anhang 2A).

Aus den Bildern kann zusammenfassend zunächst geschlossen werden, dass in gesunden Zellen verhältnismäßig mehr p21 im Zytoplasma vorzukommen scheint als in Cytochrom-c-defizienten-Zellen. Ob dieser Unterschied einer verstärkten zytoplasmatischen Expression in gesunden Kardiomyozyten oder einer abgeschwächten Expression in HCCS-defizienten Zellen entspricht, ließ sich anhand der Bilder nicht bestimmen. Der dazu nötige Vergleich von Kontroll- und *cHccs*^{+/-}-Herzen war aufgrund zu großer Streuung der Färbeintensität innerhalb der Gruppen nicht aussagekräftig. Die

qPCR- und Westernblot-Daten, die eine Induktion von p21 nachweisen, legen allerdings nahe, dass es sich um eine vermehrte zytoplasmatische Expression von p21 in gesunden Kardiomyozyten des *cHccs*^{+/-}-Herzens handelt.

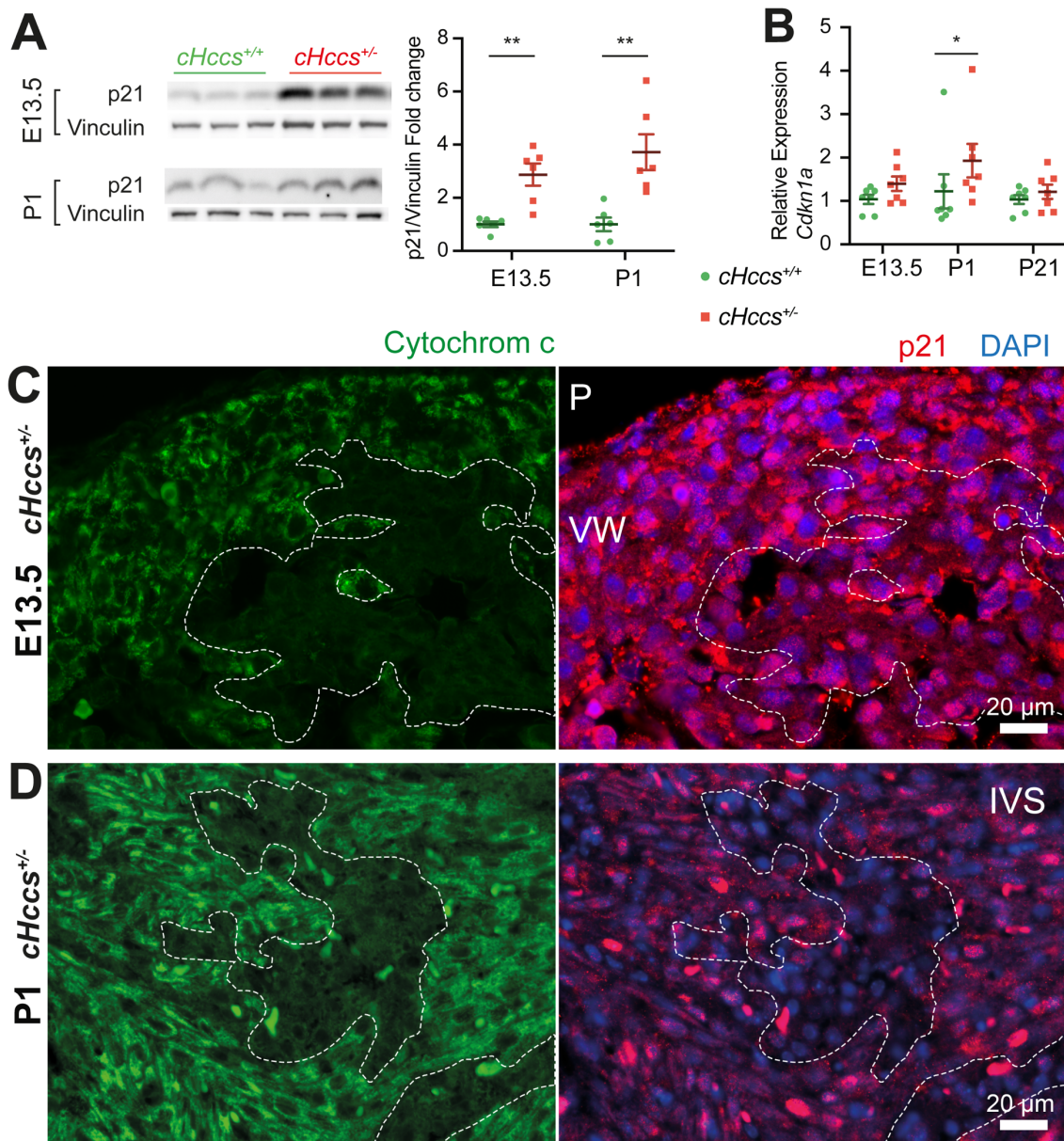


Abbildung 19: p21 ist in *cHccs*^{+/-}-Herzen induziert, aber vor allem zytoplasmatisch lokalisiert
A Der Zellzyklusinhibitor p21 war im Westernblot sowohl in E13.5 als auch P1-*cHccs*^{+/-}-Herzen im Vergleich zu Kontrollen hochsignifikant verstärkt nachweisbar (n=6 pro Gruppe) **B** In der qPCR zeigte sich nur in P1 Herzen statistische Signifikanz, tendenziell war das p21 Gen Cdkn1a aber in allen Altersstufen in *cHccs*^{+/-}-Herzen im Vergleich zur Kontrolle vermehrt exprimiert (n=7 pro Gruppe). **C+D** In der Immunfluoreszenz-Färbung zeigte sich kein Unterschied in der nukleären p21-Färbung zwischen Cytochrom-c-negativen und -positiven Bereichen des *Hccs*^{+/-}-Herzens (Zellkerne mit DAPI angefärbt). Vielmehr zeigte sich in Cytochrom-c-positiven-Bereichen im Vergleich zu Cytochrom-c-negativen-Bereichen (gestrichelte Umrandung) eine verstärkte nicht-nukleäre p21-Färbung. Dieser Unterschied zeigte sich sowohl im embryonalen (C) als auch im neonatalen (D) *cHccs*^{+/-}-Herzen (n=4 pro Gruppe). IVS – interventrikuläres Septum, P – Perikard, VW - Ventrikelwand

Zusammengefasst ließ sich also eine vermehrte Expression von p21 in embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen feststellen. Dieser verstärkten Expression liegt allerdings nicht eine vermehrte *nukleäre* Expression und damit verstärkte Zellzyklusinhibition in den *HCCS-defizienten* Zellen zugrunde. Vielmehr scheinen die *gesunden* Kardiomyozyten vermehrt *zytoplasmatisches* p21 zu exprimieren.

3.4.2 p27 ist im Gegensatz zu p21 in *cHccs*^{+/-}-Herzen nicht verändert

Gemeinsam mit dem Protein p27 (auch p27^{Kip1}), das zur gleichen CDKI-Familie gehört, ist p21 für den Zellzyklusausstieg von Kardiomyozyten im Laufe der Herzentwicklung relevant. Die Abnahme der Kardiomyozytenproliferation gegen Ende der intrauterinen Entwicklung bis zum effektiven Proliferationsstillstand nach der Geburt geht mit einem Anstieg der Expression beider CDKIs einher^{44,172}. Der Knockdown von p21 und p27 kann den Wiedereintritt neonataler und adulter Kardiomyozyten in den Zellzyklus induzieren⁴⁴.

In *cHccs*^{+/-}-Herzen kommt es in *HCCS-defizienten* Zellen zu einer Reduktion der Proliferationsrate⁴⁷. Daher könnte die verstärkte Expression von p21 (s. 3.4.1) auch Folge einer generellen Induktion von CDKIs im *cHccs*^{+/-}-Herzen sein, unabhängig von p21-spezifischen Signalwegen – wie zellulärer Seneszenz. Um dies zu überprüfen, wurde parallel zu den p21-Untersuchungen die Expression von p27 in Westernblot und Immunfluoreszenzfärbung sowohl im embryonalen als auch neonatalen Herzen untersucht.

Die Proteinanalyse im Westernblot zeigte keinen Einfluss des KO in embryonalen *cHccs*^{+/-}-Herzen (*fc* 1,12±0,12, *p*=0,49). In neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen waren die Daten der beiden durchgeführten Westernblots (biologische Replikate) widersprüchlich. Hier zeigte sich sowohl keine Veränderung in der Expression (*fc* 1,1±0,09, *p*=0,54) als auch eine Herunterregulation (*fc* 0,58±0,15, *p*=0,049) von p27 in *cHccs*^{+/-}- im Vergleich zu Kontrollherzen (s. Abbildung 20A). In der Immunfluoreszenz zeigte sich kein qualitativer Unterschied in der Expression von p27 zwischen KO-Zellen und gesunden Zellen in neonatalen Herzen und auch nicht zwischen *cHccs*^{+/-}- und Kontrollherzen (s. Abbildung 20B). Vordaten von Hennig zeigen im Gegensatz zu einer Induktion bei p21 keine Veränderung in der mRNA-Expression von p27 in embryonalen *cHccs*^{+/-}-Herzen⁷¹. Trotz der unklaren Daten im Westernblot weist nichts auf eine Heraufregulation von p27 durch den *cHccs*-KO hin. Gemeinsam mit den Immunfluoreszenz-Daten von p21 (s. 3.4.1) legt

dieser Befund nahe, dass die Induktion von p21 nicht durch die allgemeine Induktion von CDKIs verursacht wird.

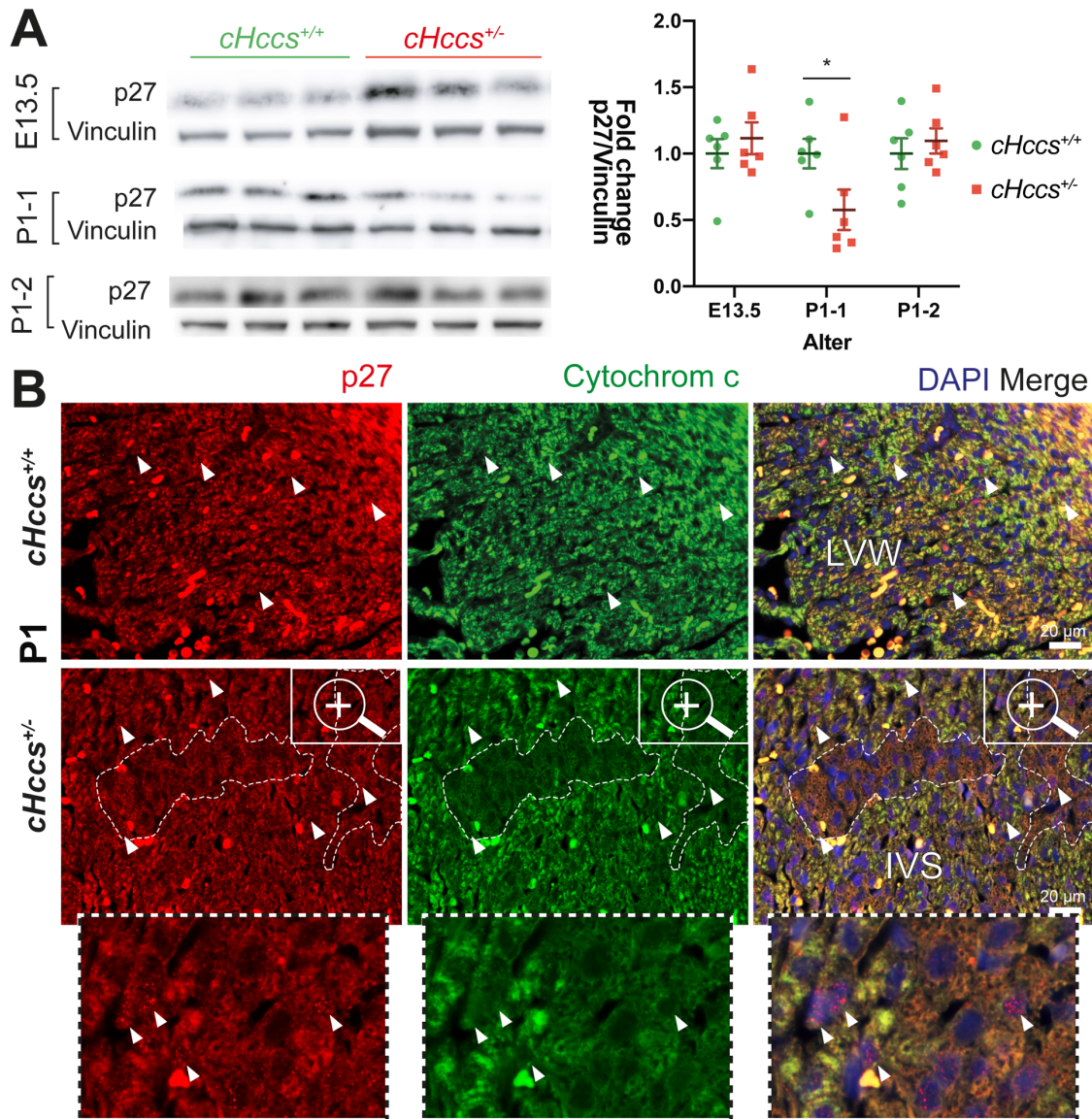


Abbildung 20: Der CDKI p27 ist im *cHccs*^{+/-}-Herzen nicht verändert

A Im Westernblot zeigte sich bei der Untersuchung von p27 in einem von zwei Datensätzen (P1-1) eine signifikante Herunterregulation im neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen ($n=6$ pro Gruppe), die in einer wiederholten Untersuchung (P1-2) und auch im embryonalen Herzen nicht gefunden werden konnte **B** Immunhistologisch konnte im neonatalen Herzen qualitativ kein Unterschied zwischen *cHccs*^{+/-}- und *cHccs*^{+/+}-Herzen oder Cytochrom-c-defizienten (beispielhaft umrandet dargestellt) und gesunden Bereichen festgestellt werden. Die p27-positiven Kerne (beispielhaft mit Pfeilspitzen markiert) waren kaum zum Hintergrundsignal abzugrenzen, wie in der Vergrößerung deutlich wird. $n=2$ pro Gruppe. IVS-interventrikuläres Septum, LVW – linksventrikuläre Wand

3.4.3 p16^{Ink4a} ist im Zytoplasma von *Hccs*-KO-Kardiomyozyten verstärkt nachweisbar

p16^{Ink4a} ist neben der SABG der verbreitetste Marker für zelluläre Seneszenz¹⁵⁶. Seine Expression markiert in vielen Fällen den *irreversiblen* Austritt aus dem Zellzyklus. Es inhibiert die Cyclin-D-abhängigen Kinasen CDK4 und 6 und verhindert die Phosphorylierung von Rb und damit den Übergang von der G1- in die S-Phase^{154,183}.

Aufgrund seiner schwierigen Detektion, fehlenden Spezifität und p16-unabhängiger zellulärer Seneszenzmechanismen ist auch p16 kein perfekter, aber dennoch weit verbreiteter Marker zellulärer Seneszenz^{72,156}.

Die in der Literatur beschriebenen Schwierigkeiten in der Detektion von p16^{72,156} traten auch hier auf. Die Expression der mRNA von *Cdkn2a* (dem für p16 kodierenden Gen) konnte in der qPCR im embryonalen und neonatalen Herzgewebe nicht untersucht werden, da keine oder nur sehr hohe, mit großer Standardabweichung behaftete C_T-Werte bestimmt werden konnten. Das verwendete Primerpaar war zuvor an Lungengewebe der gleichen Mauslinie erfolgreich optimiert worden. Die kardiale Expression von *Cdkn2a* in embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}- und Kontrollmäusen scheint somit unter der Nachweisgrenze der verwendeten Methode zu liegen.

Die Detektion der p16-Proteinlevel im Westernblot erwies sich als ähnlich schwierig. Sowohl im neonatalen als auch im embryonalen Herzgewebe zeigten die drei verwendeten Antikörper mehrere Banden im Bereich der kalkulierten Größe des p16-Proteins von etwa 16kDa. Letztendlich war keine Analyse der Proteinexpression im Westernblot möglich.

Im Gegensatz dazu zeigten sich in der Immunhistologie deutliche Auffälligkeiten. Bei Färbung mit dem Antikörper von Proteintech (Rosemont, USA) war p16 sowohl in E13.5- als auch in P1-*cHccs*^{+/-}-Herzen deutlich verstärkt im Zytoplasma Cytochrom-c-negativer Zellen im Vergleich zu benachbarten gesunden Zellen nachzuweisen (s. Abbildung 21A und B). Dieser Unterschied war in P1-Herzen deutlicher auszumachen, eventuell bedingt durch die geringere Zelldichte.

Im embryonalen Herzen waren unabhängig von der Cytochrom-c-Anfärbung vereinzelt p16-positive Kerne auszumachen (s. Abbildung 21A und Anhang 3A, Pfeilspitzen). In neonatalen Herzen war die p16-Färbung dagegen nahezu ausschließlich zytoplasmatisch (s. Abbildung 21B und Anhang 3B).

Aufgrund des auffälligen zytoplasmatischen Färbemusters in neonatalen Herzen wurde eine zweite Färbung mit einem anderen Antikörper (Abcam, Cambridge, UK) durchgeführt. Aufgrund der Spezies der Primärantikörper (Maus) erfolgte analog zur IκBα-Färbung die Markierung der KO-Zellen mit HSP60-Antikörpern (vgl. 3.2.2). Der zweite p16-Antikörper zeigte in *cHccs*^{+/-}- und Kontrollherzen ein anderes Färbemuster mit nahezu ubiquitär angefärbten Kernen und verhältnismäßig schwacher zytoplasmatischer Färbung. Die zytoplasmatische Färbung war aber auch hier in HSP60-

positiven – und damit HCCS-defizienten Zellen – stärker ausgeprägt als in gesunden Zellen (s. Abbildung 21C+D und Anhang 3C+D).

Auch wenn die Ursache für das unterschiedliche Färbemuster der beiden p16-Antikörper noch unklar ist, weisen diese Untersuchungen darauf hin, dass p16 im Zytoplasma von HCCS-defizienten-Zellen des embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen im Vergleich zu gesunden Zellen verstärkt exprimiert ist.

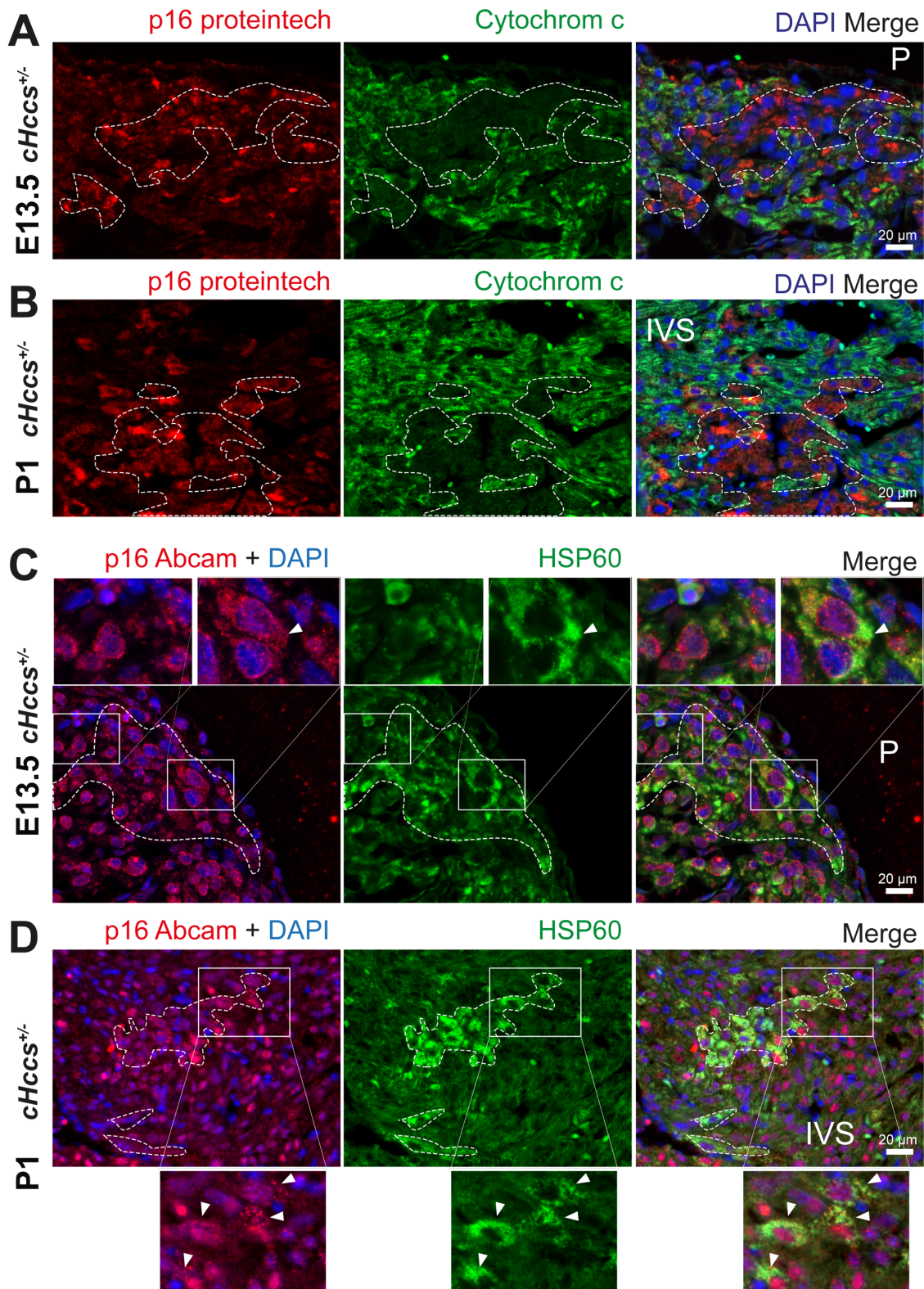


Abbildung 21: p16^{Ink4a} ist verstärkt im Zytoplasma von HCCS-defizienten-Kardiomyozyten nachweisbar
A+B Sowohl in embryonalen (A) als auch neonatalen (B) cHccs^{+/-}-Herzen färbt der p16-Antikörper von Proteintech das Zytoplasma Cytochrom-c-negativer, HCCS-defizienter Zellen (umrandete Bereiche) an.
C+D Der p16^{Ink4a}-Antikörper von Abcam färbt in cHccs^{+/-}-Herzen primär Zellkerne an. Unterschiede in dieser nukleären Anfärbung zwischen HSP60-positiven (also den HCCS-defizienten) Bereichen (umrandet) und gesunden Bereichen waren qualitativ nicht auszumachen. In den HSP60-positiven Zellen färbte auch der Abcam-Antikörper das Zytoplasma stärker an als in gesunden Bereichen (Pfeilspitzen in den Bildausschnitten). N= 4 untersuchte Herzen pro Gruppe. IVS – interventrikuläres Septum, P – Perikard

4 Diskussion

4.1 Zelluläre Seneszenz im *cHccs*^{+/-}-Herzen

4.1.1 Zelluläre Seneszenz ist im embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen nicht nachweisbar

Grundlage dieser Arbeit war die Hypothese, dass in *cHccs*^{+/-}-Herzen zelluläre Seneszenz ausgelöst wird. Diese Überlegung ergab sich aus der Beobachtung, dass *cHccs*^{+/-}-Herzen bzw. deren HCCS-defizienten Kardiomyozyten Parallelen zu den Eigenschaften und Auswirkungen zellulärer Seneszenz – unter anderem reduzierte Proliferation, Apoptose-Resistenz und Geweberegeneration – aufweisen (s. 1.4.1). Anhand verschiedener Seneszenz-Marker und Untersuchungen zum SASP sollte diese Hypothese überprüft werden. Betrachtet man die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen in der Zusammenschau, finden sich folgende Erkenntnisse in Hinblick auf eine Aktivierung des Seneszenz-Programms im *cHccs*^{+/-}-Herzen bzw. in HCCS-defizienten Kardiomyozyten:

- Induktion zellulärer Seneszenz: Zwar weist die vermehrte Phosphorylierung von H2A.X in embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen auf eine Aktivierung der *DNA damage response* (DDR) hin, diese lässt sich aber nicht in den KO-Zellen lokalisieren. AMPK α als Energiesensor der Zelle ist im Westernblot des neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen zwar tendenziell aktiviert nachweisbar, der Unterschied zur Kontrollgruppe ist allerdings nicht statistisch signifikant. Vor allem aber weist p53, Downstream-Target der DDR und von AMPK und somit die Verknüpfung dieser Signalwege zu zellulärer Seneszenz, keine signifikante Veränderung auf (s. 3.1).
- SASP und Inflammation: Weder NF κ B noch p38, die Regulatoren des SASP, noch die Zytokine des SASP selbst konnten in embryonalen und/oder neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen aktiviert/induziert nachgewiesen werden. Vielmehr scheint es zu einer Inaktivierung von NF κ B durch verstärkt nachweisbares I κ B α zu kommen (s. 3.2).
- SABG: Die Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase konnte in neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen wie auch in Kontrollherzen nicht nachgewiesen werden (s. 3.3).
- Zellzyklusinhibition: Die Induktion von p21 in *cHccs*^{+/-}-Herzen, die sowohl auf mRNA- (neonatal) als auch Proteinebene (embryonal und neonatal) nachgewiesen werden konnte, scheint auf den ersten Blick zur Hypothese der ausgelösten

zellulären Seneszenz zu passen. Die zelluläre Lokalisation von p21, das histologisch vor allem in *gesunden* Zellen vermehrt *zytoplasmatisch* nachzuweisen ist, entspricht allerdings nicht seiner erwarteten Funktion als Zellzyklusinhibitor der HCCS-defizienten Kardiomyozyten. Ähnliches gilt für p16, das zwar histologisch im Zytoplasma der KO-Zellen nachweisbar ist, aber als Zellzyklusinhibitor im Zellkern lokalisiert sein sollte⁵¹ (s. 3.4).

Der Begriff „zelluläre Seneszenz“ wird teilweise sehr unscharf benutzt, worauf insbesondere Sharpless und Sherr hinweisen¹⁵⁶. Sie verweisen unter anderem darauf, dass das übliche Vorgehen - der Nachweis gleichzeitig vorkommender Marker, deren Funktion zum Teil nicht bekannt ist (SABG) und die auch nicht spezifisch für einen Signalweg sind (z.B. CDKIs, DDR) - nicht ausreicht. Dies führe zu einer sehr weiten Definition, unter die verschiedenste zelluläre Phänotypen fallen, die mit Ausnahme von Überschneidungen bei der Expression einiger Marker wenig gemeinsam hätten. Schon beim Betrachten der in der Einleitung beschriebenen „Vielseitigkeit“ des Seneszenz-Programms und auch des SASP (s.1.2.2) fällt dieses Problem auf. Die teilweise diametral verschiedenen Auswirkungen zellulärer Seneszenz und des SASP sowie die Vielfalt der assoziierten Signalwege lassen Zweifel aufkommen, ob es hilfreich ist, ein und denselben Begriff für diese Prozesse zu verwenden. So bezweifeln Sharpless und Sherr auch, dass die sogenannte programmierte Seneszenz in der Embryonalentwicklung^{109,126} dem ursprünglich aus der Alters- und Krebsforschung bekannten Zellprozess entspricht. Sie plädieren für klarere Begrifflichkeiten und auch dafür, die einzelnen untersuchten „Marker“ zunächst als das zu sehen, was sie primär sind – zum Beispiel Zeichen der Zellzyklusinhibition, des DNA-Stresses oder inflammatorische Signale¹⁵⁶.

Die von Sharpless und Sherr geäußerten Gedanken sind nach den hier durchgeführten Untersuchungen gut nachvollziehbar. So könnte man bei Betrachtung isolierter Marker und Nachweismethoden (p21 und γ -H2A.X im Westernblot, p16 Proteintech-IF) schlussfolgern, dass zelluläre Seneszenz im *cHccs*^{+/-}-Herzen nachweisbar ist. In der Zusammenschau der vorliegenden Daten kommt man aber, trotz der Unschärfe der Definition und der Vielfältigkeit der zuvor als seneszent beschriebenen Zellen, zu einem anderen Schluss: Man muss davon ausgehen, dass zelluläre Seneszenz und der SASP in embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen keine relevante Rolle spielen. Die Hypothese, dass der *Hccs*-Knockout und die damit verbundene mitochondriale Dysfunktion in den betroffenen Kardiomyozyten des embryonalen und neonatalen *Hccs*^{+/-}-Herzens zu zellulärer Seneszenz führt, lässt sich somit nicht bestätigen.

4.1.2 Zelluläre Seneszenz im adulten *Hccs*-KO-Modell?

Wie lässt sich diese Erkenntnis einordnen, welche Schlüsse lassen sich daraus ziehen? Zelluläre Seneszenz wurde in embryonalen Kardiomyozyten *in vivo* nachgewiesen¹⁰⁹ und neben ROS im Allgemeinen ist insbesondere die Inhibition von Komplex-III ein *in vitro* nachgewiesener Auslöser zellulärer Seneszenz¹²⁵. Embryonale Kardiomyozyten sind somit grundsätzlich zu zellulärer Seneszenz fähig – allerdings handelt es sich bei der von Lorda-Diez et al. nachgewiesenen Seneszenz um den Sonderfall der programmierten Seneszenz der Organentwicklung¹⁰⁹. Diese unterscheidet sich in ihren Auslösern und Signalwegen zum Teil deutlich von den Stress-induzierten Typen zellulärer Seneszenz⁴. Stress-induzierte Seneszenz embryonaler und neonataler Kardiomyozyten wurde bisher nicht beschrieben. Insofern stellt sich die Frage, ob die unter 1.1.3 beschriebene erhöhte Stressresistenz embryonaler und neonataler Kardiomyozyten auch hinsichtlich möglicher Seneszenz-Auslöser zum Tragen kommt: Stressoren, die in anderen Zellen zu zellulärer Seneszenz führen, haben auf embryonale und neonatale Kardiomyozyten möglicherweise aufgrund der geringen Differenzierung, der hohen Resilienz und der Plastizität dieser Zellen keine Wirkung und lösen kein Seneszenz-Programm aus. Um dieser Frage nachzugehen, müssen sich Untersuchungen in einem bereits etablierten Mausmodell, in dem der heterozygote Knockout von *Hccs* pharmakologisch in adulten Herzen induziert werden kann, anschließen (bisher keine veröffentlichten Daten, Modell basierend auf Sohal et al.¹⁶¹). Falls der *Hccs*-KO im adulten Modell zelluläre Seneszenz auslösen kann, stellt sich erneut die Frage nach dem Unterschied in der embryonalen/neonatalen und adulten Stressreaktion – konkret danach, was in embryonalen und neonatalen Herzen zelluläre Seneszenz im Gegensatz zum adulten Herzen verhindert. Insbesondere aufgrund der negativen Rolle zellulärer Seneszenz in einer Vielzahl kardialer Pathologien¹⁵⁹ könnte diese Frage therapeutische Ansätze im adulten Herzen ermöglichen, wenn embryonale Schutzmechanismen in Kardiomyozyten reaktiviert werden könnten, die zelluläre Seneszenz verhindern.

Neben den Erkenntnissen über die Rolle zellulärer Seneszenz im embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen bieten die durchgeführten Untersuchungen Stoff für neue Überlegungen und Fragestellungen. Diese sollen im Folgenden, gegliedert nach den einzelnen Aspekten zellulärer Seneszenz unter denen sie untersucht wurden, diskutiert werden. Auch sie können zu einem besseren Verständnis der regenerativen und zytoprotektiven Prozesse im *cHccs*^{+/-}-Herzen beitragen.

4.2 Inflammatorische Signalwege im *cHccs*^{+/-}-Herzen

4.2.1 I κ B α in *Hccs*-KO-Kardiomyozyten – Inhibition von NF κ B oder intrinsischer Apoptose?

p38MAPK und NF κ B, beide unabhängig vom SASP wichtige Regulatoren der Inflammation und Stressantwort, wiesen in den durchgeführten Untersuchungen keine Veränderungen im *cHccs*^{+/-}-Herzen auf. Weder im Westernblot (p38 und NF κ B) noch in der Immunfluoreszenz (NF κ B) zeigte sich eine Aktivierung (s. 3.2.1 und 3.2.2). Im Gegensatz dazu war der Inhibitor von NF κ B, I κ B α , im embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen im Westernblot insgesamt (schwach) vermehrt, nicht jedoch vermehrt oder vermindert phosphoryliert nachweisbar. Immunhistologisch zeigte sich in neonatalen Herzen vermehrt I κ B α in HSP-60-positiven Kardiomyozyten. HSP-60 markiert in dem Modell vor allem *Hccs*-KO-Zellen, ist aber primär ein Marker mitochondrialen Stresses (s. 3.2.2). Diese Daten sind mit Vorsicht zu betrachten, da die im Westernblot nachgewiesenen I κ B α -Veränderungen nur sehr geringfügig sind und auch nur teilweise statistische Signifikanz aufweisen. Allerdings wurde von Magarin et al. schon die zytoplasmatische Akkumulation von I κ B α in HCCS-defizienten-Kardiomyozyten des embryonalen *cHccs*^{+/-}-Herzens nachgewiesen¹¹⁰.

Was genau könnte es mit diesen erhöhten I κ B α -Spiegeln in *Hccs*-KO-Kardiomyozyten auf sich haben? Im kanonischen NF κ B-Signalweg wird I κ B α nach seiner Phosphorylierung ubiquitiniert und daraufhin abgebaut, woraufhin NF κ B frei wird und in den Kern translozieren kann¹⁷⁷. Ein erhöhter Gesamt-I κ B α -Spiegel entspricht also einer Inhibition von NF κ B, auch wenn bei einer Inaktivierung über den kanonischen Signalweg eine hier nicht nachweisbare verminderte Phosphorylierung von I κ B α zu erwarten wäre. Allerdings war NF κ B nicht nur in den untersuchten *cHccs*^{+/-}-Herzen, sondern auch in Kontrollherzen histologisch in Kardiomyozyten nur zytoplasmatisch lokalisierbar. Da somit auch in Kontrollherzen keine NF κ B-Aktivierung in Kardiomyozyten stattzufinden scheint, kann dementsprechend auch in *cHccs*^{+/-}-Herzen keine spezifische Inaktivierung nachgewiesen werden. Dennoch könnte theoretisch der erhöhte I κ B α -Spiegel in *Hccs*-KO-Kardiomyozyten eine Aktivierung von NF κ B durch andere Signale verhindern. Denkbar ist aufgrund der pro-hypertrophen Rolle von NF κ B in der Ausbildung myokardialer Hypertrophie^{60,195,197} eine Blockade pro-hypertropher Signale (vgl. 4.4.2). Aufgrund des fehlenden direkten Nachweises einer NF κ B-Inhibition im Sinne einer reduzierten NF κ B-Aktivierung sollte hier zunächst die Auswirkung einer

I κ B α -Blockade auf das *Hccs*-KO-Modell (z.B. durch Kreuzung entsprechender KO-Mauslinien) untersucht werden, um weitere Überlegungen zu begründen.

Eine alternative Erklärung für die erhöhten I κ B α -Level in *Hccs*-KO-Kardiomyozyten bietet möglicherweise eine von NF κ B unabhängige I κ B α -Funktion. Pazarentzos et al. beschreiben *in vitro* eine anti-apoptotische Rolle von I κ B α , die von seiner inhibitorischen Funktion auf NF κ B unabhängig existiert¹³⁵. I κ B α stabilisiert dabei einen Komplex aus Hexokinase II und *Voltage-dependent anion-selective channel 1* (VDAC1) an der äußeren mitochondrialen Membran. Durch diese Stabilisation kann wiederum Bax nicht an VDAC1 binden und die sogenannte *mitochondrial outer membrane permeabilisation* (MOMP) auslösen, die durch Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium den intrinsischen Apoptose-Signalweg induziert¹³⁵. Zwar ist Bax in HCCS-defizienten Kardiomyozyten embryonaler *cHccs*^{+/-}-Herzen vermehrt mitochondrial transloziert nachweisbar¹¹⁰, dennoch könnte die apoptose-inhibierende Funktion von I κ B α durch ein Abschwächen des intrinsischen Apoptose-Signalwegs Teil der protektiven Mechanismen – wie bereits von Magarin et al. im embryonalen Herzen beschrieben¹¹⁰ – darstellen, der in HCCS-defizienten Kardiomyozyten letztlich Apoptose verhindert. Hier bedarf es weiterer Untersuchungen, insbesondere hinsichtlich der genauen Lokalisation von I κ B α und auch des eventuellen Einflusses der Cytochrom-c-Defizienz auf die geschilderte Signalkette. Daneben sollten der übergeordnete I κ B α -Kinase-Komplex (IKK), der für die Inaktivierung von I κ B α verantwortlich ist, als auch der proteasomale Abbau von I κ B untersucht werden¹⁷⁷, um ein vollständigeres Bild des NF κ B-Signalweges zu erhalten.

4.2.2 Complement Component C5a, CCL6, TIM-1, Thrombopoetin und RAGE – vielversprechende Kandidaten für weitere Untersuchungen im *cHccs*^{+/-}-Herzen

Bei der Untersuchung der Zytokine in der qPCR als auch im Zytokin-Array konnten – nach Korrektur auf multiples Testen – keine signifikanten Unterschiede zwischen neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen und gesunden Kontrollen festgestellt werden (s. 3.2.3). Dies ist in doppelter Hinsicht bemerkenswert. Zum einen widerspricht es den in der Arbeitsgruppe zuvor erhobenen – allerdings als vorläufig einzustufenden – Vordaten. Zum anderen aber erstaunt bei der Menge an untersuchten Zytokinen im Protein-Array (111 Zytokine), dass trotz einer genetischen Veränderung mit Defekt eines wesentlichen Stoffwechselprozesses wie der mitochondrialen Atmungskette kein Zytokin eine signifikante Änderung aufweisen sollte. Dafür gibt es verschiedene mögliche Erklärungen.

1. Die mitochondriale Dysfunktion hat tatsächlich keinen Einfluss auf inflammatorische Signalwege. Diese Erklärung scheint vor dem Hintergrund der bereits im embryonalen *cHccs*^{+/-}-Herzen nachgewiesenen Stressantworten¹¹⁰ und der hier nachgewiesenen Effekte auf p21, IκBα und Interferon-regulierte Gene eher unwahrscheinlich, lässt sich aber zunächst auch nicht ausschließen.
2. Das *cHccs*^{+/-}-Herz ist zum untersuchten Zeitpunkt bereits in einem Steady-State angekommen: Aufgrund der Vordaten aus dem neonatalen Herzen und der angenommenen Verzögerung eines sich ausbildenden SASP wurde das Zytokin-Array nur mit neonatalen Herzen durchgeführt. Die wesentliche Dynamik des im ersten Drittel der Trächtigkeit induzierten Gendefekts ist zu diesem Zeitpunkt eventuell schon verstrichen, sodass eine eventuell vorher ablaufende Zytokin-Ausschüttung nicht mehr messbar ist. Dies würde erneut die Plastizität des embryonalen Mausherzens belegen und ließe sich mit Untersuchungen in weiteren embryonalen Altersstufen (z.B. 13.5 und 17.5 dpc) analysieren und müsste mit Daten aus dem adulten *Hccs*-KO-Modell (vgl. 4.1.2) verglichen werden.
3. Methodische Schwäche: Bei im neonatalen Mausherzen insgesamt niedrigem Zytokinspiegeln benötigte das Array eine lange Belichtungszeit, die an den am intensivsten leuchtenden Positivkontrollen ausgerichtet war. Dies führt bei den Zytokinen im Array zu einer relativ schlechten Ausschöpfung der Grauwerte und somit zu einer schlechten Diskrimination kleinerer Unterschiede. Um statistisch messbar zu sein, müsste ein Effekt im *cHccs*^{+/-}-Herzen im Vergleich zu Kontrollen daher relativ stark sein. Eventuell kaschiert diese methodische Schwäche tatsächlich vorhandene relevante Änderungen. Hier gilt ähnliches wie für den folgenden Erklärungsversuch 4.
4. Ein vorhandener Effekt des *Hccs*-KO auf die Zytokinexpression ist zu schwach, um zu einer signifikanten, messbaren Veränderung zu führen: Im neonatalen Herzen besteht, wie schon mehrfach angedeutet und in den Limitationen der Studie noch auszuführen, ein „Problem“ mit dem Verhältnis gesunder zu defekter Zellen. Am ersten Tag nach Geburt machen die *Hccs*-KO-Zellen nur noch ungefähr 10% des myokardialen Volumens aus⁴⁷. Dies führt dazu, dass ein dort stattfindender Effekt, der im Proteinlysate des *gesamten* Herzens gemessen werden soll, sehr stark sein muss, um einen messbar signifikanten Unterschied hervorzurufen. Eine Lösung dafür

sind differenzierte Untersuchungen von HCCS-defizienten und gesunden Zellen des *cHccs*^{+/-}-Herzens, die mittels fortgeschrittener und zum größten Teil in diesem Modell noch zu etablierender Methoden möglich wären. Das Problem der schwachen Effektstärke wird allerdings durch die statistische Auswertung noch verschärft: Bei Verzicht auf die Korrektur auf multiples Testen, also der isolierten Anwendung paarweiser t-Tests, fallen fünf Zytokine als signifikant verändert auf (s. 3.2.3 und Tabelle 18). Durch die schwache Effektstärke dieser Veränderung gelten diese fünf Zytokine erst nach FDR-Korrektur nicht als signifikant verändert. Die Korrektur auf multiples Testen führt zu einem strengeren Signifikanzniveau, um eine Kumulation des α -Fehlers zu vermeiden¹⁶. Sie ist insbesondere bei Screeningmethoden wie großen mRNA-Arrays, bei denen Tausende von Genen an einem Datensatz analysiert werden, sinnvoll, um zu vermeiden, dass vielen falsch-positiven Ergebnissen nachgegangen wird. Diese Gefahr besteht hier aufgrund der überschaubaren Anzahl von fünf auffälligen Zytokinen nicht, da diese ohne großen Aufwand in weiteren Untersuchungen (z.B. ELISA) validiert werden können. Trotz fehlender formeller Signifikanz sollen diese fünf Zytokine, die ohne FDR-Korrektur in neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen verändert nachweisbar sind, daher im Folgenden als potentiell verändert diskutiert werden.

4.2.2.1 Complement Component C5/C5a

Das Komplementsystem gehört zur angeborenen Immunantwort. Nach Aktivierung kommt es zu einer Kaskade proteolytischer Aktivierung von Zymogenen (Enzymvorstufen), die in ihrer aktivierten Form multiple Funktionen in der Immunabwehr ausüben, darunter auch direkte Pathogen-Elimination und Antikörpervermittelte Opsonophagozytose¹⁴. Neben dieser bekannten Aufgabe sind nach und nach darüber hinausgehende Funktionen der Komplementbestandteile bekannt geworden¹⁵: C5a, der aktivierten Form des Zymogens C5 bzw. dem dazugehörigen Rezeptor C5aR1 wurde so unter anderem in mehreren Organen eine wesentliche Rolle in der Regeneration nach Gewebsschaden nachgewiesen: C5a-KO-Mäuse zeigen reduzierte Regenerationsfähigkeit der Leber nach toxischer Schädigung¹⁶. Vor allem aber zeigen Natarajan et al., dass C5aR1 in regenerierenden Herzen von Axolotl, Maus und Zebrafisch verstärkt exprimiert wird¹²⁹. Es war dabei primär in den Kardiomyozyten des Wundbereichs nach Apex-Resektion exprimiert, aber auch in Endothelzellen nachweisbar. C5a war von Natarajan et al. in den untersuchten regenerierenden

Mausherzen ebenfalls vermehrt nachweisbar¹²⁹. Der Knockout von C5aR1 in der Maus führte nach chirurgischer Apex-Resektion zu einem reduzierten Regenerationsvermögen, bemerkenswerterweise auch zu einem verminderten Einwandern von Makrophagen in den Wundbereich. Die genaue Funktion von C5a, C5aR1 und der beteiligten Zelltypen in der Regeneration des Myokards konnte bisher noch nicht geklärt werden. Diskutiert werden direkte Einflüsse von C5a-C5aR1 auf die Proliferation von Kardiomyozyten oder auch ein Einfluss auf die Infiltration des Myokards von Immunzellen¹²⁹.

C5a ist von allen in dieser Arbeit überprüften Zytokinen das am „signifikantesten“ veränderte (fc 1,21±0,04, $p=0,011$). Die Daten von Natarajan et al., die C5a und C5aR1 eine wesentliche Rolle in der myokardialen Regeneration zuschreiben, machen C5a somit zu einem sehr spannenden Objekt weiterer Untersuchungen. Zunächst sollte – nach Validierung der Proteinarray-Daten – analog zu den Untersuchungen von Natarajan et al. die genaue Lokalisation von C5a und zusätzlich C5aR1 in Bezug auf den Zelltyp im embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen untersucht werden. Weiterführend kämen Knockout-Untersuchungen in Betracht, um zum Beispiel zu untersuchen, welche Folgen das Fehlen von C5a im *cHccs*-KO-Modell hätte. Analog zu den Überlegungen von Natarajan et al. ist auch im *cHccs*^{+/-}-Herzen sowohl ein über einwandernde Immunzellen ausgelöster Effekt als auch ein direkter Einfluss auf Kardiomyozyten-Proliferation denkbar. So schildern Natarajan et al., dass in einem Pilotprojekt ein nicht-signifikanter, schwacher Anstieg in der Proliferation von Kardiomyozyten nach Ischämie/Reperfusion(I/R)-Schaden durch direkt therapeutisch verabreichtes C5a hervorgerufen werden konnte¹²⁹.

4.2.2.2 Chemokine-(C-C-Motif)-Ligand-6(CCL6)/C10

Chemokine sind eine große Gruppe von Zytokinen, die chemotaktisch auf Immunzellen wirken und somit an der Koordination der Immunantwort beteiligt sind. Sie setzen sich aus vier Gruppen (C, CC, CXC, CX3C) zusammen, die anhand ihrer Cysteinreste voneinander unterschieden werden³⁰. CCL6 gehört zu den CC-Chemokinen, es zieht vor allem Makrophagen chemotaktisch an. Es wird in großen Mengen bei inflammatorischen Erkrankungen, so zum Beispiel im Rahmen der akuten und chronischen Peritonitis, der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose und allergischer bronchopulmonaler Aspergillose sowie während der Wundheilung der Haut exprimiert³⁰.

In dem hier durchgeführte Zytokinarray zeigte sich eine Induktion von CCL6 in *cHccs*^{+/-}-Herzen (fc 1,82±0,16, $p=0,015$). CCL6 ist primär ein Makrophagen-

Chemotaxin. Gemeinsam mit der Beobachtung, dass C5a zu einem vermehrten Einwandern von Makrophagen in regenerierende Mausherzen führt (s. 4.2.2.1), verstärkt dies die Frage nach der Rolle von eingewanderten Immunzellen im *cHccs*^{+/-}-Herzen. Unterschiede im Vorkommen von Immunzellen zwischen *cHccs*^{+/-}-Herzen und Kontrollen wurden bisher nicht untersucht. Die Beteiligung von Makrophagen an Myokard-Regeneration ist aber bereits mehrfach beschrieben^{6,100}. Hier sind – nach Validierung der Protein-Array-Daten – weitere Untersuchungen vonnöten, die zunächst das Vorkommen von Makrophagen und anderen Immunzellen in *cHccs*^{+/-}-Herzen untersuchen sollten.

Neben der chemotaktischen Funktion von CCL6 sind direkte Einflüsse auf Kardiomyozyten denkbar: Eine Arbeit von Rosenberg et al. beschreibt ein Modell, in dem die Kultivierung von ventrikulären Kardiomyozyten zusammen mit hämatopoetischen Stammzellen zu verminderter Apoptose der Kardiomyozyten führt. Diese antiapoptotischen Effekte werden nachweisbar von CCL12, einem anderen Chemokin der CC-Familie, das durch die Stammzellen sezerniert wird, vermittelt. Im initialen Microarray zeigte sich bei Rosenberg et al. auch eine signifikante Induktion von CCL6, die in der qPCR allerdings nur tendenziell, nicht statistisch signifikant validiert werden konnte¹⁴⁵, wodurch keine weiteren Daten zu CCL6 erhoben wurden. Diese Arbeit ist trotz der limitierten Aussagen über CCL6 insofern interessant, als dass hier Kardiomyozyten und Apoptoseresistenz *in vitro*, also ohne Einfluss von Immunzellen, über Chemokine verknüpft sind. Damit ist auch im *cHccs*^{+/-}-Herzen, dessen KO-Zellen ja trotz der mitochondrialen Dysfunktion keine Zeichen von Apoptose zeigen, eine antiapoptotische Funktion von CCL6 denkbar.

4.2.2.3 *TIM-1/KIM-1/HAVCR*

T-cell immunoglobulin domain and mucin domain(TIM)-1, alternativ auch *Kidney Injury Molecule-1* (KIM-1) oder *Hepatitis A virus cellular receptor 1* (HAVCR) gehört zur TIM-Familie⁵⁷. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von 8 murinen Transmembranproteinen, die an der Regulation der Immunantwort beteiligt sind. Sie spielen eine Rolle in der Vermittlung von Transplantattoleranz, Autoimmunität und der Virusantwort⁵⁷.

TIM-1 wird dabei vor allem auf Typ-2-T-Helferzellen (Th2-Zellen) exprimiert, in geringerem Ausmaß auf Th1-Zellen und anderen Immunzellen wie Mastzellen und B-Zellen. Daneben wird TIM-1 auch im Tubulusepithel der Niere nach Nierenschaden

exprimiert (daher der alternative Name KIM-1). Es fungiert vor allem als kostimulierender Faktor für T-Zellen, nach Nierenschaden fördert es die Phagozytose apoptotischer Tubuluszellen⁵⁷. Die extrazelluläre Domäne von TIM-1 kann durch Metalloproteasen als lösliche Form abgespalten werden und dient vor allem als Marker für Tubulusschäden im Urin⁶⁶, eine inhibierende Funktion auf membranständiges TIM-1 durch kompetitive Ligandenbindung wird diskutiert¹⁵³.

TIM-1 war im durchgeführten Zytokinarray in *cHccs*^{+/-}-Herzen signifikant herunterreguliert (*fc* 0,72±0,05, *p*=0,02). Ob sich dies nur auf die lösliche Form des Rezeptors bezieht oder durch Auflösung der Zellmembranintegrität durch das Proteinarray auch membranständige Rezeptoren erfasst werden, ist unklar. Die gemessene TIM-1-Herunterregulation kann sich also sowohl auf die Expression der Rezeptoren als auch auf die lösliche, eventuell antagonistisch wirkende extrazelluläre Domäne beziehen. Dies erschwert die Diskussion dieser Daten.

Bei der Suche nach möglichen Zusammenhängen von TIM-1 mit dem *cHccs*-KO findet sich eine Arbeit von Zheng et al.: Eine Blockade der TIM-1-Funktion zeigt dort im Ischämie-Reperfusion-Modell des Gehirns einen protektiven Effekt und reduziert die Infarktgröße. Die TIM-1-Blockade reduziert dabei die Anzahl an T-Zellen, Makrophagen und Neutrophilen. Apoptose im Infarktgebiet ist reduziert, antiapoptotische Signale wie *B-cell lymphoma*(Bcl)-2 und Bcl-xl sind induziert¹⁹⁹.

Eine Übertragung auf *cHccs*^{+/-}-Herzen ist aufgrund der großen Unterschiede zwischen den Studien (Spezies, Organ, I/R-Schaden statt mitochondriale Dysfunktion) schwierig. Bcl-2 ist auch in den KO-Zellen des embryonalen *cHccs*^{+/-}-Herzen induziert¹¹⁰. Die inflammatorische Zytokinantwort, die im Modell von Zheng et al. bei I/R-Schaden auftritt, ist im Zytokin-Array des neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzens nicht nachweisbar, möglicherweise wird sie inhibiert. Dies könnte zu einer TIM-1-Herunterregulation passen. Die durch TIM-1-Blockade hervorgerufene Reduktion von Makrophagen stünde allerdings zunächst im Widerspruch zur möglichen Induktion von CCL-6 und C5a. Zudem könnte der gemessene TIM-1-Spiegel, wenn er den löslichen Rezeptor beschreibt, auch im Gegenteil einer verstärkten membranständigen TIM-1-Funktion entsprechen. Die Funktion der möglichen TIM-1-Herunterregulation bleibt zunächst also unklar. Letztlich weist der mögliche Nachweis einer veränderten Regulation eines primär auf T-Zellen exprimierten Rezeptors mit immunmodulierenden Funktionen aber vor allem erneut auf die Notwendigkeit der Untersuchung von eingewanderten Immunzellen im

cHccs^{+/-}-Herzen hin. Zunächst sollte aber auch hier eine Validierung der Zytokin-Array-Daten stattfinden.

4.2.2.4 *Thrombopoietin*

Thrombopoietin (TPO) ist das zentrale Zytokin der Thrombopoese. Es stimuliert die Proliferation und Differenzierung von Megakaryozyten und ihren Vorläuferzellen^{37,74}. TPO ist essenziell für die Thrombopoese, ein homozygoter Knockout von TPO reduziert bei der Maus die Thrombozytenzahlen auf 5-15% der Norm³⁷. Seine stimulatorische Funktion erstreckt sich über Megakaryozyten hinaus auch auf andere hämatopoetische Stammzellen⁷⁴. TPO ist zudem ein inflammatorisches Zytokin, bei Infekten wird über höhere TPO-Spiegel eine reaktive Thrombozytose ausgelöst³⁷. TPO wird – zumindest im menschlichen Organismus, sowohl embryonal als auch adult – vorwiegend in der Leber, weniger in der Niere und in geringen Mengen in anderen Organen wie dem Herzen synthetisiert^{37,162}. Sein Einfluss auf andere Organsysteme, vor allem deren Entwicklung, scheint unwesentlich, zumindest weisen TPO-Knockout-Mäuse keine über das hämatopoetische System hinausgehenden Defekte auf³⁷.

Im Zytokinarray dieser Arbeit war TPO in *cHccs*^{+/-}-Herzen herunterreguliert (f_c 0,79±0,05, $p=0,04$). Mit einer Herunterregulation von TPO assoziierte Vorgänge sind in der Literatur direkt nicht beschrieben.

Zunächst ist als Erklärung für eine Herunterregulation ein Einfluss der Thrombozyten-Spiegel denkbar: Die Regulation der Plasmaspiegel von TPO wird primär über rezeptortragende Zellen (also v.a. Megakaryozyten und Thrombozyten) als Feedbackschleife vermittelt. TPO wird von diesen internalisiert und abgebaut. Dies führt bei Thrombozytose entsprechend zu niedrigen TPO-Spiegeln und umgekehrt^{37,74,88}. Zusätzlich gibt es auch Hinweise für eine Feedbackschleife auf Ebene der Transkription: Thrombozyten-Zytokine wie TGF- β und Thrombospondin sowie Thrombozytenlysate führen *in vitro* zu einer Herunterregulation der TPO-Expression in Knochenmarkszellen. Die hauptsächlich in der Leber und Niere stattfindende TPO-Synthese ist aber nur wenig reguliert^{37,168}. Insofern könnte ein erhöhter Thrombozytenspiegel in *cHccs*^{+/-}-Mäusen zum Abfall der TPO-Konzentration führen. Allerdings wurden Thrombozytenspiegel von *cHccs*^{+/-}-Mäusen noch nicht bestimmt. Eine eventuell bestehende Veränderung dieser Spiegel und ein möglicher Einfluss des *cHccs*-KO auf die Thrombopoese selbst müssen zwar noch überprüft werden, in der Literatur fanden sich aber zunächst keine

Verbindungen zwischen Thrombopoese und den Knockout-Mechanismen des *Hccs*-KO oder dessen Folgen (wie z.B. dem hypoplastischen *cHccs*^{+/-}-Herzen).

Dahingegen wurde eine direkte protektive Funktion von TPO für Kardiomyozyten bereits mehrfach beschrieben: Sowohl *in vitro* bei I/R-Schäden, Eisenüberladung und oxidativem Stress sowie *in vitro* und *in vivo* bei Doxorubicin-Behandlung konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit TPO und pharmakologischen TPO-Agonisten Kardiomyozyten-Apoptose reduziert^{10,11,23,103}. TPO wird von seinem Rezeptor c-Mpl (*cellular myeloproliferative leukemia protein*) in Thrombozyten bemerkenswerterweise internalisiert und abgebaut¹⁰². C-Mpl ist auch auf (humanen) Kardiomyozyten nachweisbar¹¹. Insofern spricht ein verminderter TPO-Spiegel möglicherweise – konkret wurde dies noch nicht beschrieben – einer vermehrten Ligandenwirkung an seinem Rezeptor. Die kardioprotektive Wirkung von c-Mpl wird über verschiedene Downstream-Effektoren vermittelt, darunter neben p38 auch der JAK-STAT3-Signalweg^{10,11}. Dieser zeigte im neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen in HCCS-defizienten Bereichen eine vermehrte Aktivierung, die unter 4.2.3 noch besprochen werden soll.

Denkbar ist zusammenfassend, dass TPO im *cHccs*^{+/-}-Herzen über den c-Mpl-Rezeptor und u.a. JAK-STAT3 eine kardioprotektive Funktion ausübt, internalisiert und abgebaut wird und letztlich reduzierte TPO-Spiegel zu messen sind. Die TPO-Synthese findet primär in der Leber statt, im Herzen ist seine Expression aber nachgewiesen¹⁶². Insofern ist auch eine lokale Expression in den kardialen Zellen mit protektiver Wirkung auf die gesunde Kardiomyozyten-Population denkbar. Möglich ist aber auch ein systemischer Effekt von in der Leber synthetisiertem TPO. Aufgrund dieser Hypothese sollten sich, neben der initialen Validierung der Zytokin-Array-Daten, weitere Untersuchungen insbesondere von c-Mpl und seiner Downstream-Effektoren sowie der Blutspiegel von TPO und Thrombozyten in *cHccs*^{+/-}-Mäusen und Kontrollen anschließen.

4.2.2.5 Receptor for advanced glycation end products

Der *receptor for advanced glycation end products* (RAGE) gehört zur Superfamilie der Immunglobuline. Es handelt sich um einen Multiliganden-Transmembran-Rezeptor. Namensgebender Ligand sind die *advanced glycation end products* (AGE), nichtenzymatisch glykierte Moleküle. Zu weiteren wichtigen Liganden gehören S100/Calgranulin, ein extrazellulär im Rahmen chronischer Inflammation akkumulierendes Polypeptid, und *high-mobility group box protein B1* (HMGB1), das bei Nekrose von Zellen freigesetzt wird¹⁷. S100 und HMGB1 gehören zu den sogenannten

damage associated molecular pattern(DAMP)-Signalen, die infolge von Zellschaden eine Immunantwort hervorrufen⁸⁹. Darüber hinaus interagiert RAGE auch direkt mit Oberflächenproteinen von Pathogenen. RAGE vermittelt seine inflammatorischen Downstream-Effekte vor allem über die Aktivierung von NFκB¹⁷. Es existiert zudem eine lösliche (*soluble*) Form von RAGE (sRAGE), die durch proteolytisches Abtrennen der extrazellulären Domäne entsteht und als kompetitiver Inhibitor von RAGE fungiert⁸⁹. Analog zu TIM-1 (s. 4.2.2.3) ist hier unklar, ob im Zytokin-Array nur gelöstes oder auch membranständiges RAGE gemessen wurde.

RAGE ist an verschiedenen pathologischen Prozessen im Herzen beteiligt: So wird eine durch Troponin I (TnI) im Herzen experimentell ausgelöste Entzündung über HMGB1 und RAGE vermittelt. Der globale Knockout von RAGE verhindert in diesem Modell die durch TnI induzierte Inflammation. Darüber hinaus konnten in der gleichen Arbeit auch erhöhte Spiegel von HMGB1 und sRAGE in Myokarditis-Patienten nachgewiesen werden¹³. Sowohl durch mechanischen Stress als auch pharmakologisch in Kardiomyozyten induzierte Hypertrophie wird *in vitro* unter anderem über RAGE vermittelt^{105,198}. sRAGE fungiert dabei als Liganden-neutralisierender Rezeptor¹⁰⁵. In dieser Funktion konnte ihm auch eine protektive Funktion bei I/R-Schäden nachgewiesen werden, RAGE wiederum trägt zum I/R-Schaden bei^{38,155}. RAGE ist zudem ein prognostischer Faktor für Herzversagen¹³.

Im hier durchgeführten Array war RAGE in neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen im Vergleich zur Kontrolle herunterreguliert (*fc* 0,78, *p*=0,038). Dies ist aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften von RAGE bemerkenswert, insbesondere aber vor dem Hintergrund einer Arbeit von Yao et al. Dort konnte gezeigt werden, dass es nach künstlicher Induktion von Sepsis im Herzen zur Inflammation kommt. Diese wird über RAGE vermittelt und durch freiwerdende mitochondriale DNA (mtDNA) ausgelöst, die hier als DAMP fungiert und über TFAM (*Mitochondrial transcription factor A*), einem Homolog von HMGB1, zytosolisches RAGE in Kardiomyozyten aktiviert¹⁹¹. Die im Zusammenhang mit der Interferonantwort hier erhobenen Daten legen nahe, dass es auch in *cHccs*^{+/-}-Herzen aufgrund des mitochondrialen Schadens zu einer mtDNA-Stress-Antwort kommt (s. 4.2.4). Diese scheint aber nicht, wie bei Yao et al., zu einer RAGE-Induktion zu führen. Vielmehr wurde RAGE in *cHccs*^{+/-}-Herzen vermindert nachgewiesen. Wie auch schon bei der NFκB-Antwort dargestellt, scheint es hier statt einer Induktion zu einer Herunterregulation und damit möglicherweise zu einer Inhibition von RAGE-abhängigen Mechanismen – unter anderem Hypertrophie und NFκB-

Aktivierung – zu kommen. Eventuell liegt in der Inhibition dieser Pathways ein wesentlicher Schlüssel, warum der *cHccs*-Knockout in den embryonalen Herzen keine Inflammation auslöst und es zur Organregeneration kommen kann. RAGE scheint somit ein vielversprechendes Objekt weiterer Untersuchungen zu sein.

4.2.3 STAT3 und seine antiapoptotischen und antioxidativen Eigenschaften im *cHccs*^{+/-}-Herz

Neben den unter 4.2.4 im Rahmen der Interferon-Response diskutierten STAT1-Befunde fanden sich bei der Untersuchung des JAK-STAT-Weges in der Immunfluoreszenzfärbung neonataler Herzen auffällige Befunde hinsichtlich der Aktivierung bzw. Phosphorylierung von STAT3 (s. 3.2.4). Sowohl in Kontroll- als auch *cHccs*^{+/-}-Herzen fanden sich

1. Viele stark p-STAT3-positive Kerne am atrioventrikulären Übergang und in den Vorhöfen
2. Cluster von p-STAT3-positiven Kernen im gesunden Myokard

In den *cHccs*^{+/-}-Herzen fanden sich zudem

3. im Vergleich zum gesunden Gewebe vermehrt p-STAT3-positive Kerne in HCCS-defizienten Kardiomyozyten. Das p-STAT3-Signal war hier schwächer als in Befund 1 und 2.

An diesem Befund zeigt sich der Vorteil der Immunfluoreszenz gegenüber der Analyse des Gesamtorgans im Westernblot. Die relativ schwache *cHccs*^{+/-}-spezifische Aktivierung (3.) fiel im Westernblot gegenüber der in beiden Gruppen auftretenden (1. und 2.) nicht ins Gewicht, konnte aber mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen nachgewiesen werden.

STAT3 spielt in der Interaktion aller wesentlichen Zelltypen des Herzens – Kardiomyozyten, (Myo)Fibroblasten, Endothelzellen und eingewanderten Immunzellen – eine Rolle. So ist es in Kardiomyozyten an der Regulation von Zellüberleben, Wachstum, Sarkomerstruktur und des Metabolismus beteiligt. In Endothelzellen spielt STAT3 eine entscheidende Rolle für die Proliferation, Vasodilatation und vor allem auch die Angiogenese. In Fibroblasten reguliert STAT3 Gene, die die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix beeinflussen und in Immunzellen beeinflusst STAT3 die Differenzierung und die Zusammensetzung des Sekretoms dieser Zellen⁶². Dies macht deutlich, dass eine genauere Diskussion der im neonatalen Kontroll- und *cHccs*^{+/-}-Herzen gefundenen Muster der STAT3-Phosphorylierung in großem Maße vom Zelltyp abhängt,

in dem die STAT3-Phosphorylierung nachgewiesen wird. Die hier durchgeführte Kofärbung von p-STAT3 mit Cytochrom C lässt eine solche Differenzierung nicht oder nur in sehr beschränktem Ausmaß zu, da Cytochrom C als Bestandteil der Atmungskette nicht Kardiomyozyten-spezifisch exprimiert wird. Insbesondere bei Befund 2 liegt so aufgrund der Lagebeziehung zu Gefäßen die Vermutung nahe, dass es sich hier nicht um Kardiomyozyten, sondern möglicherweise um Endothelzellen und/oder hämatogen eingewanderte (Immun-)Zellen handelt. Um die Ursache und Funktion der nachgewiesenen STAT3-Phosphorylierung im neonatalen Herzen zu untersuchen, wäre der naheliegende nächste Schritt also, den Zelltyp der p-STAT3-positiven Zellen mittels geeigneter Marker für Zelltypen (z.B. Troponine für Kardiomyozyten, Vimentin für Fibroblasten, PECAM für Endothelzellen) zu identifizieren. Bevor diese Identifizierung erfolgt, ist aufgrund der vielfältigen Funktionen von STAT3 in kardialen Zellen eine weitere Diskussion der auch im physiologisch gesunden Kontrollherzen auftretenden STAT3-Aktivierung (Befund 1 und 2) vor allem im Kontext dieser Arbeit nicht zielführend.

Im Gegensatz zu den in beiden Gruppen auftretenden p-STAT3-Clustern und verstärktem p-STAT3-Signal am AV-Übergang kann im Fall der HCCS-defizienten-Areale im *cHccs*^{+/-}-Herzen angenommen werden, dass es sich bei den p-STAT3-positiven Kernen zumindest teilweise um Kardiomyozytenkerne handelt. An dieser Stelle kann über die mögliche Rolle von phosphoryliertem STAT3 kurz diskutiert werden, aufgrund der Vielzahl der möglichen Einflüsse^{62,63} sind für eine eingehende Auseinandersetzung aber weitere Daten vonnöten. Im Zusammenhang mit dem *Hccs*-KO ist vor allem die Rolle von STAT3 bei Kardiomyozyten-Überleben von Interesse: STAT3 kann durch die Induktion antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2, Bcl-xL und HSP-70 und anti-oxidativer Enzyme wie der *manganese sodium dismutase* (MnSOD) und Peroxiredoxin 2 (PRDX2) das Überleben von Kardiomyozyten fördern^{63,75,187}: Die Induktion von MnSOD durch STAT3 wurde in *in vitro*-Untersuchungen bei I/R-Schäden festgestellt¹³⁰. MnSOD wurde in *embryonalen cHccs*^{+/-}-Mäusen in HCCS-defizienten Kardiomyozyten verstärkt exprimiert nachgewiesen¹¹⁰. Auffällige Parallelen zum *cHccs*^{+/-}-Modell weist eine Arbeit von Hu et al. auf: Hier führte der herzspezifische heterozygote Knockout einer Untereinheit von Komplex I der Atmungskette zu erhöhten ROS-Leveln und der Induktion von PRDX2. Dies induzierte über Dimerisierung von STAT3 die Induktion von Bcl-2. Die Herzen dieser KO-Mäuse wiesen im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Apoptose-Resistenz auf.⁷⁵

Bcl-2 und PRDX 3 – nicht 2 – konnten in HCCS-defizienten Zellen von *embryonalen cHccs^{+/-}*-Herzen induziert nachgewiesen werden, auch wenn dies für einige andere antiapoptotische Proteine wie Bcl-xL nicht der Fall war¹¹⁰. Eine antiapoptotische Funktion des aktivierten STAT3 in HCCS-defizienten Zellen ist also denkbar.

Insgesamt zeigt sich, dass STAT3 möglicherweise eine wichtige Rolle im *cHccs^{+/-}*-Herzen spielt. Insbesondere auch vor dem Hintergrund der möglichen TPO-STAT3-Interaktion (siehe 4.2.2.4) bedarf es weiterer, gezielter Untersuchungen.

4.2.4 Die Rolle von Interferonen und damit assoziierter Gene im *Hccs*-KO-Modell

Die Untersuchung von Interferon γ und davon regulierter Gene in der vorliegenden Arbeit basierte primär auf auffälligen Ergebnissen eines RNA-Microarray von neonatalen *cHccs^{+/-}*-Herzen, in dem verschiedene Interferon-assoziierte Gene im Vergleich zur Kontrolle induziert nachweisbar waren, sowie sekundär auf einem beschriebenen Zusammenhang zwischen Interferonen und zellulärer Seneszenz. Die Vorbefunde aus dem RNA-Microarray konnten in dieser Arbeit, soweit methodisch erfolgreich, bestätigt werden. Die untersuchten Interferon-regulierten Gene waren auf mRNA-Ebene im neonatalen *cHccs^{+/-}*-Herzen im Vergleich zur Kontrolle induziert nachweisbar (s. 3.2.5). Mit *Ifit1* und *Ifit3* betrifft dies zwei Gene, die vorrangig im Zusammenhang mit der Antwort auf virale Pathogene beschrieben sind²⁹. Dies erscheint im vorliegenden Kontext zunächst nicht direkt nachvollziehbar.

Bei der Erklärung dieser vermeintlich induzierten antiviralen Antwort ist eine Arbeit von Wu und Kollegen von großem Interesse¹⁸⁶. Sie beschreiben ein Modell, in dem durch den heterozygoten Knockout von TFAM mitochondrialer DNA-Stress erzeugt wird. TFAM organisiert mitochondriale DNA (mtDNA) in sogenannten Nukleoiden, der heterozygote Knockout führt zu einer verminderten Proteinexpression von TFAM und verstärkter Freisetzung von mtDNA ins Zytoplasma der Zelle, was aufgrund des bakteriellen Ursprungs von Mitochondrien eine Immunantwort auslöst. Dieser mtDNA-Stress aktiviert eine spezielle Gruppe Interferon-stimulierter Gene (ISG), zu denen auch *Ifit1* und *Ifit3* gehören. Bemerkenswerterweise geschieht dies über die Induktion von *unphosphoryliertem* STAT1 und ohne Aktivierung der klassischen Interferon-Antwort (u.a. IL-1 und IL-6). Die ISGs vermitteln dabei eine beschleunigte und schnellere Reparatur nukleärer, im Modell durch Doxorubicin geschädigter DNA – gemessen unter anderem mittels serieller γ -H2A.X-Untersuchungen¹⁸⁶. Die vorhandenen Parallelen weisen auf ähnliche Prozesse im *cHccs^{+/-}*-Herzen hin: Durch den *Hccs*-KO und den

konsekutiven Atmungsketten-Defekt wird in HCCS-defizienten Zellen mitochondrialer Stress ausgelöst, *Ifit1* und *Ifit3* sowie unphosphoryliertes STAT1 – letzteres nicht statistisch signifikant – waren verstärkt messbar (s. 3.2.4 und 3.2.5). Diese ISG-Stressantwort unterstützt möglicherweise eine schnell ablaufende DDR im embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen, die unter 4.3 noch diskutiert werden soll.

Fragen werfen die Untersuchungen von Interferon γ auf: Immunhistologisch war in neonatalen Herzen eine schwache, aber deutliche Kolo-kalisation von IFN- γ zu HCCS-defizienten-Kardiomyozyten zu beobachten, im Westernblot des neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzens eine entsprechende Induktion (s. 3.2.5). IFN- γ wird allerdings in Kardiomyozyten selbst nicht synthetisiert¹⁰¹, es müsste sich also um gebundenes IFN- γ handeln. Als Quelle im Herzen – falls es sich nicht um eine systemische Heraufregulation handelt – kommen wiederum primär eingewanderte Immunzellen wie Makrophagen in Betracht¹⁰¹. Ob es sich bei den Westernblot- und Immunfluoreszenz-Ergebnissen um tatsächlich valide Daten handelt, muss zunächst aufgrund des unauffälligen Zytokinarraybefundes, in dem Interferon γ in neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen im Vergleich zu Kontroll-Herzen unverändert war, zumindest kritisch gesehen werden, es bedarf weiterer Validierungsschritte. Die beschriebenen möglichen Effekte von Interferon γ auf das Herz sind bisher widersprüchlich, wie von Levick und Goldspink zusammengefasst¹⁰¹ – sie umfassen negative Effekte wie Fibrose und kardiale Hypertrophie, aber auch die Reduktion kardialer Hypertrophie nach schädigenden Stimuli wie Entzündung oder Bluthochdruck. Ein klarer Zusammenhang zum *cHccs*-KO wird aus der Literatur nicht ersichtlich, der wahrscheinliche Ursprung von Interferon γ aus eingewanderten Immunzellen unterstreicht aber erneut die Notwendigkeit, dass *cHccs*^{+/-}-Herz auf diese Zellen zu untersuchen.

Unabhängig von Interferon γ zeigt die Arbeit von Wu et al. aber, dass es sich lohnt, den offenen Fragen in Bezug auf Interferon-assoziierte Signalwege im *cHccs*^{+/-}-Herzen in weiteren Untersuchungen auf den Grund zu gehen. Potentielle Angriffspunkte wären dabei die Interferon-regulierenden sowie -stimulierten Gene, insbesondere die von Wu et al. beschriebenen ISGs. Da *Ifit1* und *Ifit3* primär als Teil der Interferon-I-Antwort beschrieben sind⁷⁹, sollten in diesen Untersuchungen auch die bisher nicht untersuchten Interferone α und β Beachtung finden.

4.3 Fehlende DDR-Marker als möglicher Hinweis auf eine schnelle und effiziente DNA-Reparatur im *cHccs*^{+/-}-Herzen

Die Untersuchungen von γ -H2A.X im Westernblot zeigten eine Induktion in neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen und weisen damit auf vermehrte DNA-Schäden in diesen Herzen hin (s. 3.1.1). In embryonalen *cHccs*^{+/-}-Herzen fallen *Hccs*-KO-Zellen aufgrund ihres größeren Anteils am gesamten Gewebe (40:60 Volumenanteil) zwar deutlich mehr ins Gewicht als in neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen (10:90 Volumenanteil), eine Induktion von γ -H2A.X zeigte sich im Embryo mittels Westernblot allerdings nicht. Sollte der *Hccs*-KO und die damit verbundene mitochondriale Dysfunktion die direkte Ursache für die Induktion von γ -H2A.X sein, wären die Unterschiede zwischen embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen möglicherweise durch einen Unterschied im Energiestoffwechsel erklärbar: Während das embryonale Herz primär durch Glykolyse Energie gewinnt, wechselt das neonatale Herz nach Geburt rasch zur Fettsäureoxidation als primärer Energiequelle¹⁷⁰. Bei verstärktem Metabolismus über die mitochondriale Atmungskette hätte der Atmungsketten-Defekt des *cHccs*-KO möglicherweise einen größeren Einfluss im neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen, was mit einer Verstärkung daraus resultierender oxidativer DNA-Schäden einhergehen würde. In der IF wäre dann eine verstärkte Expression von γ -H2A.X in den HCCS-defizienten-Zellen des neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzens zu erwarten.

Die Immunfluoreszenz-Befunde konnten diese Erklärung allerdings nicht stützen, da keine klare Assoziation von γ -H2A.X und Cytochrom-c-Defizienz feststellbar war (s. 3.1.1). Die erhobenen Befunde lassen zunächst vermuten, dass es *unabhängig vom Zelltyp* im Herz der neonatalen *cHccs*^{+/-}-Tiere zu einer Heraufregulation von γ -H2A.X kommt. Zu einer Induktion von p53 als zentralen Transkriptionsfaktor der DDR kommt es allerdings nicht (s. 3.1.3). Für diese Ergebnisse gibt es verschiedene Erklärungsansätze:

Eine mögliche Erklärung für die fehlende Assoziation von γ -H2A.X zu HCCS-defizienten Kardiomyozyten bieten Nachweise, dass auch Herzinsuffizienz und kardiale Belastung zu DNA-Schäden und konsekutiver DDR im Herzen führen können⁷³. Zwar sind *cHccs*^{+/-}-Mäuse phänotypisch gesund, trotz kompensatorischer Hyperproliferation des gesunden Myokards führt der Knockout jedoch zu bei Geburt hypoplastischen Herzen. Diese weisen eine normale Kontraktilität auf und in den bisher durchgeführten Untersuchungen besteht kein Hinweis für eine funktionelle Herzinsuffizienz⁴⁸. Dennoch ist denkbar, dass die im Verhältnis zum gesunden Kontrollherzen verstärkte mechanische

Belastung des inadäquat kleinen, hypoplastischen Herzens zu DNA-Schäden führt, was den Anstieg an γ -H2A.X im neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen erklären würde. Dies wäre auch kompatibel mit der fehlenden Induktion in embryonalen *cHccs*^{+/-}-Herzen, die aufgrund der embryonalen Kreislaufsituation einer geringeren Druckbelastung unterliegen⁸⁰ und zum Zeitpunkt 13.5dpc auch keine hypoplastische Morphologie aufweisen⁴⁷. Die fehlende Induktion von p53, das bei einer *im gesamten Herzen* induzierten DDR nicht unverändert bleiben dürfte, spricht allerdings zunächst gegen diese Hypothese.

Warum bleibt p53 trotz der Hinweise auf DNA-Schäden in *cHccs*^{+/-}-Herzen unverändert? Eine wichtige Funktion von p53 in der DDR, neben der transkriptionellen Induktion von Proteinen der DNA-Reparatur, besteht darin, den DNA-Reparaturmechanismen Zeit zu geben, bevor der Zellzyklus weiter voranschreitet und die defekte DNA weitergegeben wird¹⁸⁵. Folgende Hypothese bietet eine mögliche Erklärung für die hier erhobenen Befunde: Kommt es bei (durch γ -H2A.X angezeigten) DNA-Schäden zu einer schnellen Reparatur, wird p53 nicht benötigt. Aufgrund des schnellen Wachstums und der hohen Zellteilungsrate während der Embryonalentwicklung ist eine schnelle DNA-Reparatur von großer Bedeutung. DNA-Schäden, die durch den *cHccs*-KO in embryonalen Kardiomyozyten entstehen, könnten aufgrund schneller Reparatur möglicherweise gar nicht erst detektiert werden. Im Neonaten wären sie zwar schwerwiegend genug, um wie beobachtet γ -H2A.X zu induzieren, p53 würde allerdings aufgrund immer noch effizienter DNA-Reparatur in seiner Zellzyklus-verlangsamenden Funktion nicht benötigt. Dies würde auch zu der unter 4.2.4 beschriebenen, DDR-beschleunigenden ISG-vermittelten mtDNA-Stressantwort passen.

Um diese Hypothesen weiter zu untersuchen, müssten zunächst weitere Bestandteile der DDR (z.B. ATM/ATR, Chk1/2, s. 1.2.3.1) im *cHccs*^{+/-}-Herzen bzw. in HCCS-defizienten Kardiomyozyten, möglichst an zusätzlichen Altersstufen zwischen und nach E13.5 und P1 überprüft werden. Der Einfluss eines Atmungskettendefektes – wie durch den *Hccs*-KO vermittelt – auf die Effizienz und Dynamik der DDR in Kardiomyozyten ließe sich am ehesten *in vitro* untersuchen. Hier sind serielle Untersuchungen von DDR-Faktoren¹⁸⁶ (bspw. γ -H2A.X) in kultivierten Kardiomyozyten, deren Komplex III pharmakologisch durch Antimycin A inhibiert wird, in kurzen Zeitabständen möglich.

4.4 Mehr als Zellzyklusinhibition? Die Rolle von CDKIs im embryonalen und neonatalen Herzen

Die beiden Zellzyklusinhibitoren p16 und p21 wurden in dieser Arbeit zunächst hinsichtlich ihrer Rolle im Rahmen der zellulären Seneszenz untersucht. Ihre Funktion hierbei ist die Unterbrechung des Zellzyklus durch Inhibition von Cyclin-abhängigen Kinasen (Details siehe 1.2.3.2). Nach initialen Ergebnissen, in denen sich p21 in der qPCR des neonatalen und im Westernblot des embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen induziert zeigte, lag zunächst auch eine entsprechende Rolle in den HCCS-defizienten Kardiomyozyten des Mausmodells nahe. Das immunhistologische Bild entsprach allerdings nicht einer solchen Funktion – p21 wurde *im Zytoplasma* der *gesunden* Kardiomyozyten im Vergleich zu den HCCS-defizienten Zellen verstärkt nachgewiesen, ohne sichtbaren Unterschied in der nukleären Anfärbung (s. 3.4.1). Dieses Färbemuster entspricht damit nicht der erwarteten Funktion von p21 als Zellzyklusinhibitor *im Nukleus*⁸⁵. Der CDKI p16 konnte leider nicht erfolgreich im Westernblot und auf mRNA-Ebene untersucht werden. Immunhistologisch war aber auch p16 auffällig mit verstärkter *zytoplasmatischer* Anfärbung in den HCCS-defizienten Zellen (s. 3.4.3). Ähnlich wie bei p21 würde man auch hier bei einer Funktion als Zellzyklusinhibitor eine nukleäre Lokalisation erwarten⁵¹. p21 und p16 verhalten sich also nicht so, wie bei zellulärer Seneszenz der HCCS-defizienten Zellen zu erwarten wäre. Sie weisen aber dennoch Veränderungen durch den *cHccs*-KO auf. Dies wirft erneut die Frage auf, wie diese Veränderungen mit den zellprotektiven und regenerativen Prozessen im *cHccs*^{+/-}-Herzen zusammenhängen.

4.4.1 Zytoplasmatische p16-Induktion als möglicher Kompensationsmechanismus in HCCS-defizienten Kardiomyozyten

p16 ist vielfach als Tumormarker in humanen Studien beschrieben und untersucht¹⁵¹. Die Bedeutung seiner subzellulären Lokalisation wird noch debattiert¹³¹. Grundsätzlich wird davon ausgegangen, dass die CDK-inhibierende Funktion im Nukleus stattfindet. Eine spezifische zytoplasmatisch lokalisierte Form von p16 wurde allerdings mehrfach beschrieben^{51,64,131}. Die genaue Funktion dieser zytoplasmatischen Form ist noch unklar. Diskutiert werden unter anderem eine CDK4-Bindung durch p16 im Zytoplasma, die den Transport von CDK4 in den Zellkern unterbindet oder alternativ auch die nukleäre Bindung von CDK4 durch p16 und die folgende Translokation ins Zytoplasma. Beides würde dann zu einer Inhibition der Zellzyklus-fördernden Funktion von CDK4 führen.

Alternative Hypothesen besagen, dass es sich bei zytoplasmatischem p16 um eine funktionell inaktivierte oder defekte mutierte Form handelt^{51,131}.

Die beschriebenen Arbeiten beschäftigen sich vor allem mit der Bedeutung von p16 für humane nicht-kardiale Tumoren, was die Übertragbarkeit auf das *cHccs*^{+/-}-Modell einschränkt. Die Existenz einer speziellen zytoplasmatischen p16-Unterform im Menschen und insbesondere die unterschiedliche Affinität verschiedener Antikörper rückt die hier erhobenen Daten der Immunfluoreszenz-Färbung allerdings in neues Licht. Bemerkenswerterweise gibt es starke Hinweise, dass kommerziell erhältliche Antikörper eine unterschiedliche Affinität gegenüber den verschiedenen p16-Formen haben^{64,151}. Vor diesem Hintergrund deutet vieles darauf hin, dass p16 in HCCS-defizienten Kardiomyozyten des embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzens im Vergleich zu den gesunden Zellen verstärkt in einer zytoplasmatischen Form vorkommt. Diese wird scheinbar isoliert von dem p16-Antikörper der Firma Proteintech erkannt, während der Antikörper der Firma Abcam eine höhere Affinität zur nukleären Form aufzuweisen scheint und daher den Unterschied zwischen HCCS-defizienten und gesunden Zellen in der zytoplasmatischen Anfärbung weniger deutlich werden lässt (vgl. 3.4.3 und Abbildung 21).

Von den diskutierten Funktionen der zytoplasmatischen p16-Form erscheint in den HCCS-defizienten Kardiomyozyten aufgrund der bekannten reduzierten Proliferation dieser Zellen die oben beschriebene CDK4-Bindung durch zytoplasmatisches p16 mit daraus folgender Zellzyklusinhibition am plausibelsten^{47,51,131}. Die Tatsache, dass zytoplasmatisches p16 häufig auch negativer prognostischer Marker ist, der bei schnell wachsenden Tumoren auftritt⁶⁴, macht allerdings die Unsicherheit dieser Hypothese deutlich.

Unabhängig von der subzellulären Lokalisation wurden bereits über Zellzyklusinhibition hinausgehende Funktionen von p16 beschrieben¹⁹. Von Interesse für die vorliegende Arbeit sind dabei vor allem Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Grossman^{77,174}: Von ihnen konnte an Melanozyten, Fibroblasten und Keratinozyten zunächst gezeigt werden, dass oxidativer Stress (durch UV-Strahlung oder H₂O₂-Behandlung vermittelt) über p38-Aktivierung zu einer Induktion der p16-Expression führt. Der Knockout/Knockdown von p16 führte zu erhöhten intrazellulären ROS-Spiegel und zu vermehrten oxidativen DNA-Schäden, durch exogene p16-Zufuhr wurden diese Veränderungen verhindert. Dieser von p16 vermittelte Effekt war unabhängig von seiner zellzyklus-regulierenden Funktion⁷⁷. In weiteren Untersuchungen konnte dann gezeigt

werden, dass p16 eine wichtige Rolle in der Bildung von Mitochondrien spielt: Die Mitochondrien von p16-Knockout-Fibroblasten sind vergrößert, weisen eine reduzierte respiratorische Kapazität auf und generieren vermehrt Superoxide. Die Überexpression von p16 erhöht wiederum die respiratorische Kapazität und vermindert die Bildung von Superoxiden¹⁷⁴. Die hier aufgezeigte Verknüpfung von p16 und der mitochondrialen Funktion könnte helfen, die Funktion des zytoplasmatisch verstärkt nachweisbaren p16 in HCCS-defizienten Zellen des *cHccs*^{+/-}-Herzens zu analysieren und zu verstehen: Möglicherweise handelt es sich bei der Induktion des zytoplasmatischen p16 in HCCS-defizienten Kardiomyozyten um einen, durch den KO-induzierten oxidativen Stress getriggerten, kompensatorischen Mechanismus. Dieser könnte dem Atmungskettendefekt und der daraus folgenden verstärkten ROS-Bildung in HCCS-defizienten Kardiomyozyten entgegenwirken, indem er die respiratorische Effizienz zu steigern und ROS-Bildung zu reduzieren versucht. Dieser These widerspricht möglicherweise, dass die von Jenkins et al. nachgewiesene Aktivierung von p16 über p38 hier im Westernblot nicht nachgewiesen werden konnte (s. 3.2.1). Auch immunhistologisch war eine Aktivierung von p38 zumindest in embryonalen *cHccs*^{+/-}-Herzen bisher nicht verändert nachweisbar¹¹⁰.

Insgesamt stehen die Untersuchung von p16 im *cHccs*^{+/-}-Herzen noch am Anfang. Zur Bestätigung der Immunfluoreszenz-Daten sollten zunächst verfügbare kommerzielle Antikörper validiert und Untersuchungen auf subzellulärer Ebene (konfokale Mikroskopie, Zellfraktionierung) durchgeführt werden.

4.4.2 Die zwei Gesichter von p21 - mögliche Implikationen für das Überleben HCCS-defizienter Kardiomyozyten

Wenn Zellzyklusinhibition nicht der Grund für die Induktion von p21 im *cHccs*^{+/-}-Herzen ist - was hat es damit auf sich? Und welche Rolle spielt die zytoplasmatische Lokalisation in gesunden, nicht aber in HCCS-defizienten Kardiomyozyten?

Die subzelluläre Lokalisation von p21 bedingt deutliche Unterschiede in seiner Funktion. Während nukleäres p21 bei der DDR und zellulärer Seneszenz die Zellzyklusinhibition vermittelt, besitzt zytoplasmatisches p21 CDK-unabhängige zytoprotektive, vor allem anti-apoptotische Eigenschaften^{22,61,85,98}. Diese konnte auch von Meijles et al. in Kardiomyozyten bei oxidativem Stress¹²⁰ nachgewiesen werden. Der *cHccs*-KO führt in den betroffenen Kardiomyozyten wie beschrieben vermutlich zu oxidativem Stress¹¹⁰, allerdings wurde zytoplasmatisches p21 in *gesunden*, nicht in

HCCS-defizienten Kardiomyozyten nachgewiesen. Möglicherweise entsteht auch in diesen gesunden Kardiomyozyten durch den Knockout Zellstress – etwa durch die notwendige Hyperproliferation oder die möglicherweise kompensatorisch erhöhte mechanische Beanspruchung der gesunden Kardiomyozyten (vgl. 4.3). Die zytoplasmatische p21-Induktion könnte somit einen zytoprotektiven Mechanismus gegenüber diesen Stressoren darstellen – weitere Belege für diese These fehlen aber bislang, antiapoptotische Signale wurden im embryonalen *cHccs*^{+/-}-Herzen etwa nur in den HCCS-defizienten Kardiomyozyten nachgewiesen¹¹⁰.

In eine andere Richtung weist eine Arbeit von Volland et al. Diese konnten zeigen, dass die Regulation von p21 durch BRAP (*BRCAl associated protein*) wesentlich für Herzentwicklung, Kardiomyozytenproliferation und -überleben ist¹⁸⁰. Während der Knockout von BRAP im Embryo zum Proliferationsstopp von Kardiomyozyten führt, kommt es im adulten Herzen zur Apoptose. Vermittelt wird dies durch p21, dessen Expression von BRAP inhibiert wird und das zudem von BRAP durch Bindung seiner Kernlokalisationssequenz im Zytoplasma gehalten wird. Der Knockout von BRAP führt dementsprechend zu einer erhöhten Expression und verstärktem Kernsignal von p21. Eine Überexpression von BRAP in transgenen Mäusen führt wiederum zur Retention von p21 im Zytoplasma und Induktion des Zellzyklus in Kardiomyozyten, ohne dass es – wohlgemerkt bei Untersuchung in fünf Tage alten Mäusen – zu vermehrter Teilung kommt¹⁸⁰. Diese Daten zeigen, dass eine vermehrte zytoplasmatische Lokalisation von p21 ein proliferatives Signal darstellen kann. So gedeutet, wäre das vermehrt zytoplasmatisch nachweisbare p21 in gesunden Kardiomyozyten hinsichtlich der kompensatorischen Hyperproliferation dieser Zellen natürlich von großem Interesse. Stark einschränkend muss dazu allerdings bedacht werden, dass die von Volland et al. beschriebene Überexpression von BRAP nicht nur zu einer zytoplasmatischen Translokation von p21, sondern vor allem auch zu einer verminderten Expression führt. Dies steht im Widerspruch zur nachgewiesenen Induktion von p21 im embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen.

Hauck et al. konnten in primären, neonatalen Rattenkardiomyozyten und in p21-Knockout-Mäusen nachweisen, dass der antihypertrophe Effekt von Statinen durch p21-Regulation vermittelt wird. Statine induzieren dabei über den Transkriptionsfaktor FoxO3a die Expression von p21 und über eine Aktivierung der Kinase AKT wiederum die Phosphorylierung von p21. Diese Phosphorylierung führt zur zytoplasmatischen Translokation von p21, was dort durch Bindung an Rho-Kinasen eine durch

Angiotensin II verursachte zelluläre Hypertrophie der Kardiomyozyten verhindert⁶⁹. Auch Xu et al. konnten eine antihypertrophische Wirkung von zytoplasmatischen p21 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachweisen¹⁸⁹. Zytoplasmatisches p21 hat im Herzen also auch eine antihypertrophe Funktion, die möglicherweise im embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen zum Tragen kommt. Die von Hauck et al. beschriebenen Signalwege FoxO3a und Akt wurden bereits im *adulten cHccs*^{+/-}-Herzen (10 Wochen alt) untersucht⁴⁸: Hier zeigte sich ebenfalls eine Aktivierung von Akt, allerdings auch eine vermehrte *inaktivierende* Phosphorylierung von FoxO3a. Diese Veränderungen haben keine anti-hypertrophe Wirkung, eher tragen sie zur kompensatorischen Hypertrophie adulter *cHccs*^{+/-}-Herzen bei⁴⁸. Dies ist allerdings kein Widerspruch zu einer antihypertrophen Funktion in embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen: Es ist bekannt, dass regenerationsfähige (Zebrafisch und embryonale Nager) und nicht-regenerationsfähige Herzen (adulte Nager) nach Schädigung zum Teil die gleichen Signalwege aktivieren, diese Aktivierung aber unterschiedliche Folgen nach sich zieht. So sind NFκB- und Jak/STAT-Signale im Zebrafischherzen Teil der hyperplastischen Regeneration, im adulten Säugerherzen führen diese Signalwege zur Hypertrophie⁸⁶.

Die Arbeiten von Hauck et al. und Xu et al. lassen eine anti-hypertrophe Wirkung des vermehrt zytoplasmatisch exprimierten p21 in den gesunden Kardiomyozyten des embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzens sehr gut möglich erscheinen. Diese antihypertrophe Funktion begünstigt möglicherweise entscheidend das hyperplastische, regenerative Wachstum der gesunden Kardiomyozyten. Ein möglicher antihypertropher Einfluss von Akt und FoxO3a ist insbesondere aufgrund der Daten aus dem adulten *cHccs*^{+/-}-Herzen von Interesse: Den Unterschied zwischen pro-hypertrophem und anti-hypertrophem Effekt – warum also eine Aktivierung von Akt im adulten Herzen eine pro-hypertrophe und im regenerationsfähigem Herzen eine anti-hypertrophe Wirkung hat – zu verstehen, könnte therapeutische Möglichkeiten eröffnen, die statt einer hypertrophen Reaktion auf Stress eine hyperplastische Reaktion begünstigen.

Wie bei p16 stehen die Untersuchungen zur Funktion von p21 im *cHccs*^{+/-}-Herzen am Anfang, weitere Untersuchungen müssen folgen. Neben genaueren Untersuchungen der subzellulären Lokalisation in der konfokalen Mikroskopie, ggf. mit Markern zellulärer Kompartimente, könnten funktionelle Untersuchungen mittels p21-Knockout Aufschluss über seine Funktion geben. Die beschriebenen Interaktionspartner – insbesondere Akt, FoxO3a, aber auch BRAP (s.o.) – sowie eine mögliche Phosphorylierung von p21, die seine zytoplasmatische Lokalisation beeinflusst²⁷, sollten ebenfalls in embryonalen und

neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen untersucht werden. Zudem sollten Untersuchungen von p21 im adulten *cHccs*^{+/-}-Herzen durchgeführt werden, um vor allem die diskutierte antihypertrophe Funktion von zytoplasmatischem p21 im kompensatorisch hypertrophierten Myokard dieser Herzen zu untersuchen.

4.5 Limitationen der Studie

4.5.1 Fokus auf zelluläre Seneszenz

Die vorliegende Arbeit hat als zugrunde liegendes Thema den Nachweis zellulärer Seneszenz in Kardiomyozyten des *cHccs*-KO-Modells. Dazu wurden zahlreiche assoziierte Signalwege untersucht, die über zelluläre Seneszenz als „kleinsten gemeinsamen Nenner“ verbunden sind. Der Nachweis zellulärer Seneszenz in *cHccs*^{+/-}-Herzen gelang damit nicht. Die einzelnen untersuchten Seneszenz-Marker geben aber darüber hinaus auch Aufschlüsse über ihre „primären“ Signalwege wie die DDR, Inflammation und Zellzyklusinhibition. Da diese Signalwege aber hier vor allem in ihrer Funktion im Rahmen zellulärer Seneszenz überprüft wurden, beschränken sich die Untersuchungen auf einzelne Bestandteile größerer Signalkaskaden wie dem JAK-STAT- und dem NFκB-Signalweg. Diese wurden für sich gesehen somit nur oberflächlich untersucht, was folgerichtig die Aussagekraft in Bezug auf ihre Rolle im *cHccs*^{+/-}-Herzen einschränkt und eine Vielzahl an weiteren Untersuchungen erfordern würde.

4.5.2 Momentaufnahme dynamischer Prozesse

Der heranwachsende Mausembryo sowie die neonatale Maus befinden sich naturgemäß in einem sehr dynamischen Zustand. In der Entwicklung durchläuft der Embryo im Rahmen der Morpho- bzw. Organogenese eine Vielzahl sich schnell ändernder zellulärer Prozesse. Der Neonat muss sich nach der Geburt an das extrauterine Leben anpassen. Daraus resultiert, dass Stoffwechselprozesse und Signalwege – auch die hier untersuchten – sich verhältnismäßig schnell ändern können. Dies bedingt zum einen möglicherweise eine größere Schwankungsbreite bei Untersuchungsergebnissen, da schon Unterschiede von wenigen Stunden im Alter bei Präparation der Herzen Einfluss auf die gemessenen Parameter haben können. Zum anderen bedeutet dies, dass die hier präsentierten Daten nur einen Einblick in die untersuchten Altersstufen geben können.

Dies gilt in doppelter Hinsicht für die Untersuchungen zellulärer Seneszenz, einem Stoffwechselprozess mit großer Dynamik, der sich in Phasen über eine geraume Zeit entwickelt⁷². Ob so zu einem späteren Zeitpunkt oder zwischen den beiden untersuchten

Altersstufen zelluläre Seneszenz in HCCS-defizienten Kardiomyozyten mittels der untersuchten Marker nachzuweisen wäre, ist also nicht auszuschließen. Auch wenn hier etwas irreführend von embryonalen und neonatalen Herzen gesprochen wird - die vorliegende Arbeit ist streng genommen in ihrer Aussage auf die beiden Zeitpunkte 13.5dpc und 1. Tag postnatal limitiert.

4.5.3 Limitationen einer Gesamtorgananalyse

Wie bereits in der Diskussion der Ergebnisse der histologischen Untersuchungen und des Zytokinarrays teilweise angesprochen, bringt die Analyse des gesamten Herzens, wie sie hier bei qPCR- und Western-Blot-Experimenten durchgeführt wurde, einige Limitationen mit sich. Das murine Herz besteht nach Geburt nur zu maximal 60% aus Kardiomyozyten. Die restliche Zellmasse setzt sich aus unterschiedlichsten Zellen zusammen – u.a. Endothelzellen, Fibroblasten und Leukozyten^{12,137}. In den hier durchgeführten Protein- und RNA-Analysen wurden Lysate des ganzen embryonalen und neonatalen Herzens untersucht, die alle Zelltypen miteinschließen. Die gemessenen Daten können somit nicht nur auf Vorgänge im Kardiomyozyten zurückgeführt werden. Auch in der immunhistologischen Untersuchung ist zwar aufgrund der Zellmorphologie und Lage der Zellen eine gewisse qualitative Unterscheidung möglich. Eine genaue Abgrenzung wäre aber auch hier nur mit Zelltyp-spezifischen Kofärbungen möglich, auf die aus Gründen der Praktikabilität und möglichen Interferenz verzichtet werden musste.

4.5.4 Gesunde vs. KO-Zellen

Während in embryonalen *cHccs*^{+/-}-Herzen (13.5 dpc) noch 40% der Kardiomyozyten HCCS-defizient sind, ist durch die regenerative Hyperproliferation der gesunden Zellen im neonatalen Herzen dieser Anteil auf 10% abgesunken⁴⁷. Bei der Analyse des gesamten Organs im Westernblot und der qPCR, die nicht zwischen KO- und gesunden Kardiomyozyten unterscheiden, müssten daher auftretende Effekte in KO-Kardiomyozyten relativ stark sein, um im Vergleich zu Kontrollherzen signifikant messbar zu sein. Dies kann nur zum Teil durch histologische Untersuchungen ausgeglichen werden, da nicht alle erforderlichen Immunfluoreszenz-Färbungen technisch möglich sind (z.B. durch Fehlen geeigneter Antikörper). Schwache Effekte in KO-Kardiomyozyten des neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzens können somit hier nicht als signifikant gemessen werden. Dies betrifft insbesondere die Zytokinarrays (vgl. auch 4.2.2). Hier könnten in Zukunft ggf. Möglichkeiten wie Durchflusszytometrie und *single cell RNA-Sequenzierung* (scRNA-Seq) Abhilfe schaffen.

4.5.5 Mögliche Einflussfaktoren des KO-Modells

Das Cre-LoxP-System ist ein weit verbreitetes Tool zur Genmodifikation, birgt aber einige mögliche Limitationen im Sinne eines Konfundierungseffektes. Probleme ergeben sich unter anderem aus unspezifischer Cre-Aktivität, Toxizität oder unvollständiger Exzision der geflochten Zielsequenz¹¹⁸. So kann alleine die Aktivität von Cre zu DNA-Schäden führen¹⁰⁸, eine Immunantwort auslösen¹³⁶ und Kardiomyopathien verursachen¹⁸. In den bisherigen Arbeiten mit dem *Hccs*-KO-Mausmodell konnten allerdings keine derartigen Effekte beobachtet werden. Dadurch wurde hier nicht von einem Einfluss des Cre-LoxP-Systems ausgegangen und auf konsequente Auswahl Cre-positiver Kontrollherzen verzichtet. Ein entgegen den bisherigen Erfahrungen auftretender Effekt von Cre kann somit allerdings nicht ausgeschlossen werden.

4.6 Fazit und Ausblick

Dieser Dissertationsarbeit lagen folgenden Fragen zugrunde (s. 1.4.3):

1. Ist zelluläre Seneszenz Teil der Reaktion embryonaler und neonataler Kardiomyozyten auf mitochondrialen Stress?
2. Spielen inflammatorische Prozesse im regenerierenden Herzen des *Hccs*-KO-Modells eine Rolle?

Die erste Frage kann nach den durchgeführten Untersuchungen zumindest für das hier untersuchte Modell verneint werden (s. 4.1.1) – zelluläre Seneszenz ist im embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen nicht nachweisbar.

Die zweite Frage lässt sich weniger eindeutig beantworten. Auf den ersten Blick kann man auch sie verneinen: Eine deutliche Aktivierung inflammatorischer Signale war in den embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen nicht nachweisbar, zentrale inflammatorische Regulatoren wie NFκB und p38 waren unverändert, die Zytokin-Arrays zeigten formell keine statistisch signifikante Veränderung. Auf den zweiten Blick sind es kleine Veränderungen wie die Heraufregulation von IκBα (s. 4.2.1) und das schwach verstärkte p-STAT3-Signal (s. 4.2.3) in HCCS-defizienten Kardiomyozyten, die Auffälligkeiten der Interferon-stimulierten Gene (s. 4.2.4) und nicht zuletzt auch die vor Korrektur signifikant veränderten Zytokine (s. 4.2.2), die vermuten lassen, dass inflammatorische Prozesse zumindest im Sinne von Bestandteilen inflammatorischer Signalwege durchaus eine Rolle im embryonalen und neonatalen Herzen des *cHccs*-KO-Modells spielen. Auch wenn die zugrundeliegende Hypothese – die Induktion zellulärer Seneszenz in *Hccs*-KO-Kardiomyozyten und ihr positiver Einfluss auf die Regeneration

des *cHccs*^{+/-}-Herzens – somit nicht bestätigt werden konnte, legen die in dieser Arbeit gefundenen Veränderungen im *cHccs*^{+/-}-Herzen die Grundlage für vielversprechende neue Überlegungen.

Abbildung 22 stellt schematisch die wichtigsten aufgestellten Hypothesen der Diskussion dar. Diese lassen sich in fünf zentralen Themengebiete zusammenfassen:

Mitochondriale Stressreaktion:

Wie reagiert das embryonale und neonatale *cHccs*^{+/-}-Herz auf den mitochondrialen Stress in HCCS-defizienten Kardiomyozyten? Neben den bereits von Magarin et al. beschriebenen Kompensationsmechanismen¹¹⁰ konnten hier Hinweise auf zusätzliche mitochondriale Stressantworten gefunden werden: Die nachgewiesene Induktion von STAT1 und der Interferon-stimulierten Gene *Ifit1* und *Ifit3* im neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen weist auf eine von Wu et al. beschriebene mitochondriale Stressreaktion hin, die zu einer beschleunigten DNA-Reparatur der Zelle führt (s. 4.2.4). Dies erklärt möglicherweise die ebenfalls nachgewiesene Induktion des DNA-Schäden markierenden Histons γ -H2A.X in neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen ohne konsekutiv nachweisbare p53-Aktivierung (s. 4.3). Daneben übt auch zytoplasmatisches p16, das in HCCS-defizienten Kardiomyozyten nachgewiesen werden konnte, über mitochondriale Kompensationsmechanismen eine antioxidative Schutzfunktion aus, die möglicherweise hier zum Tragen kommt (s. 4.4.1).

Apoptose-Inhibition:

Neben der mitochondrialen Stressreaktion gehören auch anti-apoptotische Mechanismen zu den zytoprotektiven Maßnahmen in *cHccs*^{+/-}-Herzen. Einige der in dieser Arbeit erhobenen Daten lassen sich mit anti-apoptotischen Signalwegen in Verbindung bringen. Insbesondere gilt dies für TPO (s. 4.2.2.4) und den Jak/STAT-Signalweg (s. 4.2.3), aber auch $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (s. 4.2.1) und – wenn auch mit vielen Fragezeichen – für TIM-1 und CCL6 (s. 4.2.2.3).

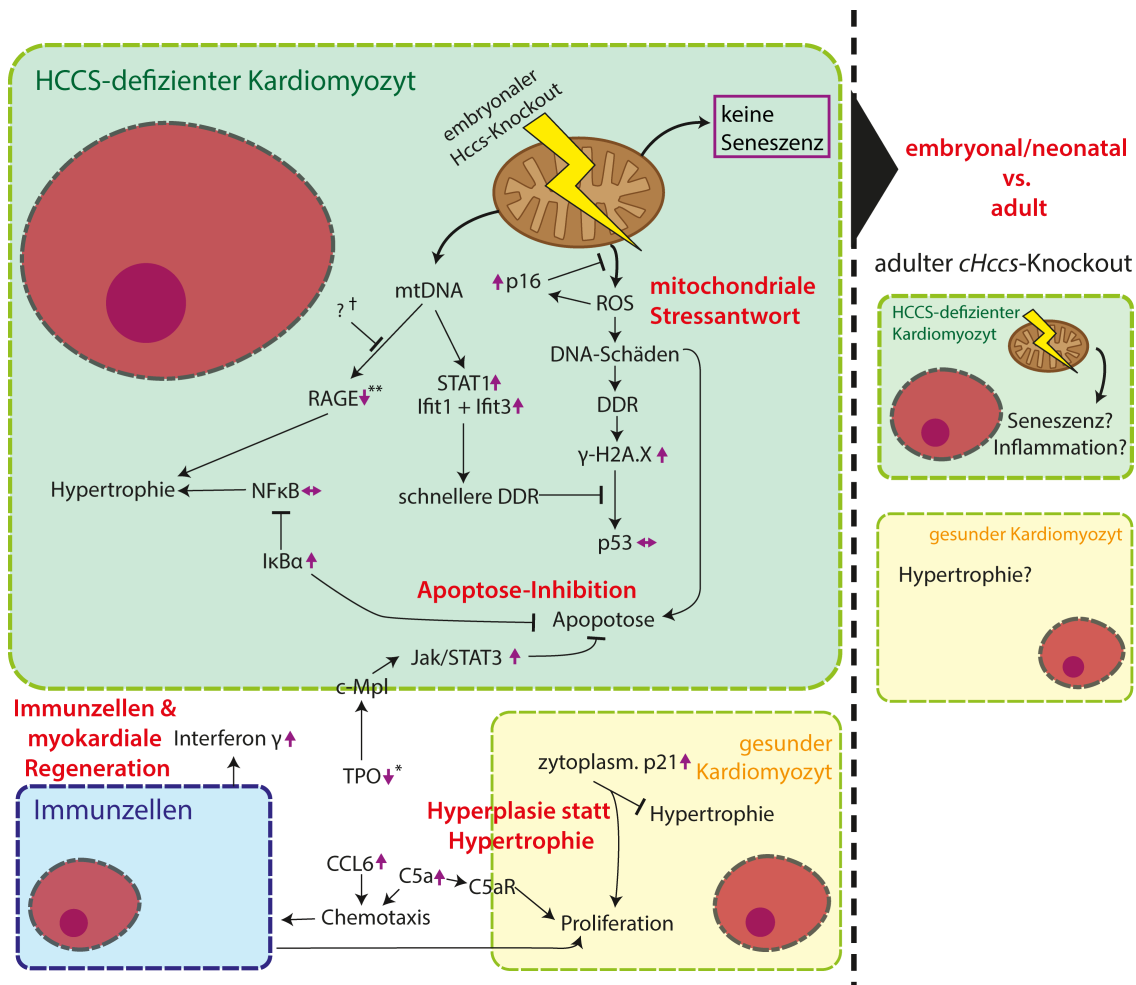


Abbildung 22: Grafische Darstellung wichtiger Ergebnisse und der davon abgeleiteten Hypothesen. Die Abbildung stellt schematisch die sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergebenden und diskutierten Hypothesen dar. Diese lassen sich fünf übergeordneten Themengebieten zuordnen (rote Schlagwörter). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind violett (Pfeile, Kästen) markiert, aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf eine getrennte Darstellung der teilweise nur im neonatalen $cHccs^{+/-}$ -Herzen erhobenen Daten verzichtet. Zur Erläuterung siehe Abschnitt 4.6 und entsprechende Unterkapitel der Diskussion. *TPO wird durch seinen Rezeptor internalisiert und abgebaut, eine Reduktion des TPO-Spiegels entspricht somit vermutlich einem verstärkten intrazellulären TPO-Signal. **Die lösliche Form von RAGE (sRAGE) wirkt inhibierend auf RAGE selbst, es ist unklar, welche Form vom Zytokin-Array erfasst wird. †postulierte Inhibition der RAGE-Induktion durch mtDNA-Stress aufgrund der gemessenen Herunterregulation, aufgrund der negativen Rolle von RAGE für kardiale Pathologien von Interesse.

Immunzellen und kardiale Regeneration:

Die Rolle von Inflammation und insbesondere Makrophagen für kardiale Regeneration sind vielfach beschrieben^{6,65,100,173}. Der Nachweis erhöhter Spiegel verschiedener Chemotaxine (C5a, CCL6) und von Immunzellen exprimierter Zytokine (Interferon γ , TIM-1) in der vorliegenden Arbeit legt nahe, dass auch im $cHccs^{+/-}$ -Herzen Immunzellen an der Reaktion auf den *Hccs*-Knockout beteiligt sind (s. 4.2.2 und 4.2.4).

Hyperplasie vs. Hypertrophie:

Der große Unterschied zwischen embryonalen und neonatalen im Gegensatz zum adulten Herzen ist die Fähigkeit zu hyperplastischem Wachstum von Kardiomyozyten. Dies

ermöglicht die Herzregeneration im embryonalen/neonatalen Säugerherzen. In gesunden Kardiomyozyten des *cHccs*^{+/-}-Herzens konnte vermehrt zytoplasmatisches p21 nachgewiesen werden. Aufgrund seiner anti-hypertrophen Eigenschaften ist es möglicherweise daran beteiligt, dass diese Zellen nicht hypertrophieren, sondern mittels gesteigerter Proliferation den Verlust funktionstüchtiger Kardiomyozyten durch den *Hccs*-KO kompensieren (s. 4.4.2). Auch mit den erhöhten IκBα-Spiegeln (als Inhibitor von NFκB) – wohlbemerkt in HCCS-defizienten Kardiomyozyten – sowie der Herunterregulation von RAGE im Zytokin-Array, fanden sich andere anti-hypertrophe Veränderungen, die Beachtung finden sollten (s. 4.2.1 und 4.2.2.5).

Unterschiede zwischen embryonaler/neonataler und adulter kardialer Stressreaktion:

Die Grundlage für diese Arbeit und darüber hinaus für einen wesentlichen Teil des Forschungsfeldes der Herzregeneration bildet die Tatsache, dass embryonale und neonatale Maus Herzen im Vergleich zum adulten Organ erhöhtes regeneratives Potential aufweisen. Von entscheidender Bedeutung zur Einordnung der hier erhobenen Daten ist daher der Vergleich zur Reaktion des adulten Herzens auf den gleichen Stressor: Der embryonal aktivierte *Hccs*-KO führt im embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen weder zu einer deutlichen inflammatorischen Antwort noch zu zellulärer Seneszenz, allerdings zu einer hyperplastischen Proliferation der gesunden Kardiomyozyten. Wie verhält sich im Vergleich dazu das adulte Herz bei induziertem heterozygoten *Hccs*-KO? Und was passiert mit den adulten Herzen des hier beschriebenen genetisch induzierten *Hccs*-KO? Finden sich hier zelluläre Seneszenz, Apoptose, inflammatorische Signale oder eine hypertrophe Antwort? Wie verhält sich die DNA *damage response*, welche Rolle spielen mitochondriale Stressantworten? Diese Fragen und entsprechende Untersuchungen sollen dazu dienen, mögliche Unterschiede zwischen regenerationsfähigen und regenerationsunfähigen Herzen zu finden. Dies soll letztlich dabei helfen, auch das menschliche Herz in seiner sehr eingeschränkten Regenerationsfähigkeit und Stressresistenz zu unterstützen. Das *Hccs*-KO-Modell ermöglicht in vielfältiger Weise Untersuchungen dieser Unterschiede – mögliche neue Ansätze dazu wurden hier aufgezeigt. Insofern tragen auch die hier vorgelegten Daten hoffentlich dazu bei, einmal die große Krankheitslast kardialer Erkrankungen zu lindern.

Zusammenfassung

Embryonale und neonatale Kardiomyozyten (KM) weisen eine höhere Stressresistenz und proliferative Kapazität auf als adulte KM. Diese Fähigkeiten konnten durch unsere Arbeitsgruppe bereits in einem Knockout-Mausmodell gezeigt werden: In den sogenannten *cHccs*^{+/-}-Herzen weisen 50% der KM zur Hälfte der Embryonalentwicklung eine mitochondriale Dysfunktion auf. Dies wird bis zur Geburt durch Hyperproliferation der gesunden KM kompensiert, während die defekten KM verschiedene Stressmechanismen aktivieren und überleben. *cHccs*^{+/-}-Herzen weisen dabei Charakteristika zellulärer Seneszenz (ZS) auf, einer Stressantwort mit regenerativem Potential, die sich durch Zellzyklusinhibition und die Sekretion bestimmter inflammatorischer Zytokine, den Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP), auszeichnet. Das Ziel dieser Arbeit war, ZS und den SASP in *cHccs*^{+/-}-Herzen zu untersuchen, um ihren Einfluss auf die Stressresistenz von KM und die Regeneration des embryonalen Herzens zu ergründen. Dazu wurden ZS-Marker und inflammatorische Signalwege auf molekularer und histologischer Ebene in embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}- und Kontroll-Herzen untersucht.

In neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen war vermehrt γ -H2A.X nachweisbar, eine Histon-Variante, die bei DNA-Schäden auftritt. Die DNA-Reparaturantwort kann ZS über den Transkriptionsfaktor p53 auslösen. p53 wies in *cHccs*^{+/-}-Herzen allerdings keine Veränderung auf. NF κ B und p38 MAP-Kinase, die wichtigsten Regulationsfaktoren des SASP, wiesen ebenfalls keine Aktivierung oder Induktion auf, dies galt auch für wichtige SASP-Zytokine. Die Proteinexpression von p21^{Cip1}, einem *cyclin dependent kinase inhibitor* (CDKI) und wichtigem Seneszenz-Marker, war dagegen in embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen deutlich erhöht. Diese Induktion trat erstaunlicherweise nicht in den defekten KM auf, p21^{Cip1} war histologisch vielmehr im Zytoplasma der gesunden KM vermehrt nachweisbar. Im Gegensatz dazu war p16^{Ink4a}, ein anderer CDKI und ZS-Marker, histologisch vermehrt im Zytoplasma der defekten KM nachweisbar. Die für ZS bedeutsame Zellzyklus-inhibierende Funktion der CDKI ist normalerweise mit einer nukleären Lokalisation assoziiert. Diese Befunde weisen also nicht auf eine solche inhibitorische Funktion von p16^{Ink4a} und p21^{Cip1} hin. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass ZS keine Rolle im embryonalen und neonatalen *cHccs*^{+/-}-Herzen und den zugrundeliegenden zytoprotektiven und regenerativen Prozessen zu spielen scheint.

Auch wenn ZS nicht im *cHccs^{+/-}*-Herzen nachgewiesen werden konnte, weisen die Ergebnisse dieser Arbeit auf andere Signalwege hin, die im embryonalen und neonatalen Herzen Zytoprotektion und Regeneration unterstützen könnten. Signalwege, die weiter untersucht werden sollten, umfassen sowohl mitochondriale Stressantworten, antioxidative und anti-apoptotische Mechanismen, das Immunsystem als auch die mögliche anti-hypertrophe Rolle von zytoplasmatischen p21. Da adulte Herzen geringere Stressresistenz und praktisch keine regenerative Kapazität aufweisen, sollte zudem die Antwort des adulten Herzens auf den gleichen mitochondrialen Stress untersucht werden. Die Untersuchungen dieser neuen Ansätze können helfen, letztlich die Stressantwort embryonaler und neonataler Kardiomyozyten weiter zu entziffern.

Summary

Embryonic and neonatal cardiomyocytes (CM) show higher stress resistance and proliferative capacity following injury compared to adult CM. Our group has previously shown these abilities in a knockout mouse model in which 50% of CM of the so-called *cHccs*^{+/-} hearts exhibit mitochondrial dysfunction at mid-gestation. This is compensated until birth by hyperproliferation of healthy CM while the surviving defective CM activate several stress responses. *cHccs*^{+/-} hearts show characteristics of cellular senescence (CS), a stress response with regenerative potential marked by cell cycle inhibition and the secretion of characteristic cytokines (referred to as senescence associated secretory phenotype - SASP). The aim of this study was to investigate CS and SASP in *cHccs*^{+/-} hearts to explore their role in CM stress resistance and embryonic heart regeneration. To achieve this, markers of CS and inflammatory pathways were molecularly and histologically analysed in embryonic and neonatal *cHccs*^{+/-} and control hearts.

Neonatal *cHccs*^{+/-} hearts showed increased expression of γ -H2A.X, a histone variant indicating DNA damage. The DNA damage response can induce CS via p53, whose expression and cellular localisation was unaltered, however. Neither NF κ B and p38, the main regulatory factors of the SASP, nor major SASP cytokines showed activation or induction in *cHccs*^{+/-} hearts as well. Conversely p21^{Cip}, a cyclin dependent kinase inhibitor (CDKI) characteristic for CS, exhibited increased protein expression in embryonic and neonatal *cHccs*^{+/-} hearts. Strikingly, this induction was not restricted to defective cells but p21^{Cip} rather exhibited increased cytoplasmic localisation in healthy compared to defective CM. By contrast, p16^{Ink4a}, another CS-marking CDKI, showed increased cytoplasmic expression in embryonic and neonatal defective CM. Notably, the cell cycle inhibition by CDKIs which is characteristic for CS is usually associated with their nuclear localisation. These findings therefore do not support a cell cycle inhibitory role. Taken together, these results indicate that cellular senescence does not play a role in the embryonic and neonatal *cHccs*^{+/-} heart and does not seem to be involved in the underlying protective and regenerative mechanisms.

Although CS could not be detected in *cHccs*^{+/-} hearts, the results of this study point towards other cellular pathways that may promote cytoprotection and regeneration in the embryonic and neonatal heart. Pathways that require further study include mitochondrial stress pathways, antioxidative and anti-apoptotic mechanisms, the immune system as well as the role of cytoplasmic p21^{Cip} as a possible anti-hypertrophic agent. Since adult hearts

exhibit reduced stress resistance and effectively no regenerative capacity, the response of the adult heart towards the same mitochondrial stress should be explored as well. Following these loose ends may again help to decipher the embryonic and neonatal cardiac stress response.

Abkürzungsverzeichnis

AMP *5'-adenosine-monophosphate*

AMPK *5'-adenosine-monophosphate-activated protein kinase*

APS *Ammoniumperoxodisulfat*

ATM *ataxia-telangiectasia mutated*

ATP *Adenosidtriphosphat*

ATR *ataxia telangiectasia and Rad3-related*

AV-Übergang *atrioventrikulärer Übergang*

Bcl *B-cell lymphoma*

bp *Basenpaare*

BRAP *BRCA1 associated protein*

BSA *Bovines Serumalbumin*

CCL *Chemokine-(C-C-Motif)-Ligand*

CDK *cyclin dependent kinase*

CDKI *cyclin dependent kinase inhibitor*

cDNA *komplementäre DNA*

cHccs^{-/-} herzspezifischer homozygoter Knockout der Holocytochrom-C-Synthetase

cHccs^{+/-} herzspezifischer heterozygoter Knockout der Holocytochrom-C-Synthetase

cHccs^{y/-} herzspezifischer hemizygoter Knockout der Holocytochrom-C-Synthetase

C_T *cycle of threshold*

CXCL *chemokine (C-X-C motif) ligand*

CytC *Cytochrom C*

DAMP *damage associated molecular pattern*

DAPI *4',6-Diamidin-2-phenylindol*

ddH₂O *doppelt destilliertes Wasser*

DDR *DNA damage response*

DNA *Desoxyribonukleinsäure*

dNTP *Desoxynukleosidtriphosphate*

dpc *days post conceptionem*

E13.5 *Embryo an Tag 13.5 nach Konzeption*

ECL *enhanced chemiluminescence*

EDTA *Ethylendiamintetraessigsäure*

fc fold change

HCCS *Holocytochrom-C-Synthetase*

HMGB1 *high-mobility group box protein B1*

HPLC *high performance liquid chromatography*

HRP *horse radish peroxidase*

HSP *heat shock protein*

I/R *Ischämie/Reperfusion*

IF *Immunfluoreszenz*

Ifit interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats

IFN *Interferon*

IGFBP *Insulin-like-growth-factor-binding-proteins*

IKK *I κ B-Kinase-Komplex*

IL *Interleukin*

I κ B *Inhibitor of NF κ B*

JAK *Januskinase*

KO *Knockout*

loxP locus of X-over P1

MKK *MAPK kinases*

MnSOD *manganese sodium dismutase*

mRNA *messenger ribonucleic acid*

mtDNA *mitochondriale DNA*

NC *Nitrocellulose*

NEMO *NF κ B essential modifier*

NF κ B *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NGS *normal goat serum, Ziegenserum*

Nkx2.5 *NK2 homeobox 5*

NTC *no template control*

OCT *Optimum Cutting Temperature Compound*

P1 *neonatale Maus am Tag der Geburt*

p38MAPK *p38 mitogen-activated protein kinasen*

PCNA *proliferating cell nuclear antigen*

PCR *polymerase chain reaction*

PFA *Paraformaldehyd*

PRDX2 *Peroxiredoxin 2*

PRDX3 *Thioredoxin-dependent peroxide reductase*
 qPCR *quantitative real time PCR*
 RAGE *receptor for advanced glycation end products*
 Rb *retinoblastoma protein*
 RIPA *Radioimmunoprecipitation assay buffer*
 RISP *Rieske iron-sulfur protein*
 ROS *reactive oxygen species, Sauerstoffradikale*
 rpm *Umdrehungen pro Minute*
 RS *replikative Seneszenz*
 rT *reverse Transkription*
 RT *Raumtemperatur*
 SABG *Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase*
 SASP *senescence associated secretory phenotype*
 SDS *sodium dodecyl sulfat, Natriumdodecylsulfat*
 SDS-Page *SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese*
 SEM *standard error of the mean, Standardfehler*
 SOD2 *Superoxide dismutase 2*
 SRY *sex determining region of Y*
 STAT *signal transducer and activator of transcription*
 TFAM *Mitochondrial transcription factor A*
 Th2-Zellen *Typ-2-T-Helferzellen*
 TIM *T-cell immunoglobulin domain and mucin domain*
 TnI *Troponin I*
 TPO *Thrombopoietin*
 Tris *Tris(hydroxymethyl)aminomethan*
 TSA *Tyramide Signal Amplification*
 UPR *unfolded protein response*
 VDAC1 *Voltage-dependent anion-selective channel 1*
 WT *Wildtyp*
 X-Gal *5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid*

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Regeneration des embryonalen Herzens im <i>cHccs</i> -KO-Modell im Verlauf der zweiten Gestationshälfte	4
Abbildung 2: Auslöser und Funktionen der zellulären Seneszenz	8
Abbildung 3: Signalwege der zellulären Seneszenz	12
Abbildung 4: Gemeinsamkeiten zellulärer Seneszenz und des <i>cHccs</i> -KO-Modells	15
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Arbeitshypothese.....	16
Abbildung 6: Kreuzschema zur Generierung des herzkonditionalen <i>Hccs</i> -Knockouts..	27
Abbildung 7: Beispiel-Agarosegel zur Genotypisierung	30
Abbildung 8: Der DDR-Marker γ -H2A.X ist im neonatalen <i>cHccs</i> ^{+/-} -Herzen verstärkt nachweisbar, eine Assoziation mit KO-Zellen nicht eindeutig feststellbar	47
Abbildung 9: AMPK zeigt keine signifikante Aktivierung im embryonalen oder neonatalen <i>cHccs</i> ^{+/-} -Herzen im Vergleich zur Kontrollgruppe.....	50
Abbildung 10: p53, der wichtigste Transkriptionfaktor der DDR und Vermittler der zellulären Seneszenz, ist im <i>cHccs</i> ^{+/-} -Herzen nicht verändert	51
Abbildung 11: Keine Aktivierung von p38MAPK in <i>cHccs</i> ^{+/-} -Herzen nachweisbar.....	53
Abbildung 12: Keine Anzeichen für NF κ B-Aktivierung in <i>cHccs</i> ^{+/-} -Herzen	55
Abbildung 13: Der NF κ B-Inhibitor I κ B α ist in <i>Hccs</i> -KO-Zellen erhöht	58
Abbildung 14: <i>Il1b</i> und <i>Il6</i> sind im neonatalen <i>cHccs</i> ^{+/-} -Herzen nicht signifikant reguliert	59
Abbildung 15: Im neonatalen <i>cHccs</i> ^{+/-} -Herzen ist keine vermehrte Zytokin-Expression im Vergleich zu Kontrollen nachweisbar.....	60
Abbildung 16: Der <i>Hccs</i> -KO bedingt in HCCS-defizienten Kardiomyozyten eine Aktivierung von STAT3, die aber auch davon unabhängig in <i>cHccs</i> ^{+/-} - und Kontrollherzen auftritt.....	64
Abbildung 17: In HCCS-defizienten Zellen des neonatalen <i>cHccs</i> ^{+/-} -Herzens ist Interferon γ , im neonatalen <i>cHccs</i> ^{+/-} -Herzen Interferon-stimulierte Gene induziert ..	68

Abbildung 18: Kein Nachweis von Seneszenz-assoziiertes β -Galaktosidase in fünf Tage alten *cHccs*^{+/-}-Herzen..... 70

Abbildung 19: p21 ist in *cHccs*^{+/-}-Herzen induziert, aber vor allem zytoplasmatisch lokalisiert..... 73

Abbildung 20: Der CDKI p27 ist im *cHccs*^{+/-}-Herzen nicht verändert 75

Abbildung 21: p16^{Ink4a} ist verstärkt im Zytoplasma von HCCS-defizienten-Kardiomyozyten nachweisbar..... 78

Abbildung 22: Grafische Darstellung wichtiger Ergebnisse und der davon abgeleiteten Hypothesen..... 107

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laborgeräte	19
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	20
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien	20
Tabelle 4: Puffer und Lösungen.....	22
Tabelle 5: Größenstandards	22
Tabelle 6: Enzyme und kommerzielle Kits.....	22
Tabelle 7: Inhibitoren.....	23
Tabelle 8: Signalverstärkung und - konservierung	23
Tabelle 9: Primer für Genotypisierung	23
Tabelle 10: Primer für qPCR	23
Tabelle 11: Antikörper.....	24
Tabelle 12: Software und Online-Tools.....	25
Tabelle 13: PCR-Ansatz und -Zyklus	29
Tabelle 14: Reaktionsansatz reverse Transkription	32
Tabelle 15: Reaktionsansatz und -zyklus der qPCR.....	34
Tabelle 16: Zusammensetzung Gele Westernblot	37
Tabelle 17: Wichtige Zytokine des SASP sind im Zytokin-Array des neonatalen <i>cHccs</i> ^{+/-} -Herzen im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert	61
Tabelle 18: Im neonatalen <i>cHccs</i> ^{+/-} -Herzen signifikant veränderte Zytokine bei Verzicht auf die Korrektur für multiples Testen.....	61
Tabelle 19: Die im Zytokinarray des neonatalen Mausherzen am stärksten exprimierten Zytokine	62
Tabelle 20: Statistisch signifikant induzierte Interferon-stimulierte Gene im neonatalen <i>cHccs</i> ^{+/-} -Herzen, fold change in Bezug auf <i>cHccs</i> ^{+/+} -Kontrollen.....	66

Literaturverzeichnis

1. Alspach E, Flanagan KC, Luo X, et al. p38MAPK Plays a Crucial Role in Stromal-Mediated Tumorigenesis. *Cancer Discov.* 2014;4(6):716-729. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0743
2. van Amerongen MJ, Engel FB. Features of cardiomyocyte proliferation and its potential for cardiac regeneration. *J Cell Mol Med.* 2008;12(6A):2233-2244. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00439.x
3. Anderson R, Lagnado A, Maggiorani D, et al. Length-independent telomere damage drives post-mitotic cardiomyocyte senescence. *EMBO J.* 2019;38(5):e100492. doi:10.15252/embj.2018100492
4. Aravinthan A. Cellular senescence: a hitchhiker's guide. *Hum Cell.* 2015;28(2):51-64. doi:10.1007/s13577-015-0110-x
5. Asefa B, Klarmann KD, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Keller JR. The interferon-inducible p200 family of proteins: a perspective on their roles in cell cycle regulation and differentiation. *Blood Cells Mol Dis.* 2004;32(1):155-167. doi:10.1016/J.BCMD.2003.10.002
6. Aurora AB, Porrello ER, Tan W, et al. Macrophages are required for neonatal heart regeneration. *J Clin Invest.* 2014;124(3):1382-1392. doi:10.1172/JCI72181
7. Ausma J, Thoné F, Dispersyn GD, et al. Dedifferentiated cardiomyocytes from chronic hibernating myocardium are ischemia-tolerant. In: Cohen MV, Gelpi RJ, Downey JM, Slezak J, eds. *Myocardial Ischemia and Reperfusion*. Molecular and Cellular Biochemistry. Springer US; 1998:159-168. doi:10.1007/978-1-4615-4979-6_19
8. Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SAR, Zornoff LAM. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol.* 2016;106(1):62-69. doi:10.5935/abc.20160005
9. Baddour JA, Sousounis K, Tsonis PA. Organ repair and regeneration: An overview. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev.* 2012;96(1):1-29. doi:10.1002/bdrc.21006
10. Baker JE, Su J, Hsu A, et al. Human thrombopoietin reduces myocardial infarct size, apoptosis, and stunning following ischaemia/reperfusion in rats. *Cardiovasc Res.* 2008;77(1):44-53. doi:10.1093/cvr/cvm026
11. Baker JE, Su J, Koprowski S, Dhanasekaran A, Aufderheide TP, Gross GJ. Thrombopoietin receptor agonists protect human cardiac myocytes from injury by activation of cell survival pathways. *J Pharmacol Exp Ther.* 2015;352(3):429-437. doi:10.1124/jpet.114.221747
12. Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, Borg TK, Baudino TA. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 2007;293(3):H1883-H1891. doi:10.1152/ajpheart.00514.2007
13. Bangert A, Andrassy M, Müller AM, et al. Critical role of RAGE and HMGB1 in inflammatory heart disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(2):E155-E164. doi:10.1073/pnas.1522288113

14. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*. 2006;444(7119):633. doi:10.1038/nature05268
15. Beauséjour CM, Krtolica A, Galimi F, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J*. 2003;22(16):4212-4222. doi:10.1093/emboj/cdg417
16. Benjamini Y, Yekutieli D. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Ann Stat*. 2001;29(4). doi:10.1214/aos/1013699998
17. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med*. 2005;83(11):876-886. doi:10.1007/s00109-005-0688-7
18. Buerger A, Rozhitskaya O, Sherwood MC, et al. Dilated Cardiomyopathy Resulting From High-Level Myocardial Expression of Cre-Recombinase. *J Card Fail*. 2006;12(5):392-398. doi:10.1016/j.cardfail.2006.03.002
19. Buj R, Aird KM. p16: cycling off the beaten path. *Mol Cell Oncol*. 2019;6(6). doi:10.1080/23723556.2019.1677140
20. Campisi J. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annu Rev Physiol*. Published online 2014:685-705. doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183653.Aging
21. Campisi J, D'Adda Di Fagagna F. Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Published online 2007. doi:10.1038/nrm2233
22. Cazzalini O, Scovassi AI, Savio M, Stivala LA, Prosperi E. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A in the DNA damage response. *Mutat Res Mutat Res*. 2010;704(1):12-20. doi:10.1016/j.mrrev.2010.01.009
23. Chan S, Chan GC, Ye J, Lian Q, Chen J, Yang M. Thrombopoietin Protects Cardiomyocytes from Iron-Overload Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Injury. Published online 2015:9.
24. Chang BD, Xuan Y, Broude EV, et al. Role of p53 and p21 waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene*. 1999;18(34):4808. doi:10.1038/sj.onc.1203078
25. Chapman J, Fielder E, Passos JF. Mitochondrial dysfunction and cell senescence: deciphering a complex relationship. *FEBS Lett*. 2019;593(13):1566-1579. doi:10.1002/1873-3468.13498
26. Chien Y, Scuoppo C, Wang X, et al. Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev*. 2011;25(20):2125-2136. doi:10.1101/gad.17276711
27. Child ES, Mann DJ. The Intricacies of p21 Phosphorylation: Protein/Protein Interactions, Subcellular Localization and Stability. *Cell Cycle*. 2006;5(12):1313-1319. doi:10.4161/cc.5.12.2863
28. Childs BG, Baker DJ, Kirkland JL, Campisi J, van Deursen JM. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep*. 2014;15(11):1139-1153. doi:10.15252/embr.201439245
29. Choi YJ, Bowman JW, Jung JU. A Talented Duo: IFIT1 and IFIT3 Patrol Viral RNA Caps. *Immunity*. 2018;48(3):474-476. doi:10.1016/j.immuni.2018.03.001
30. Coelho AL, Schaller MA, Benjamim CF, Orlofsky AZ, Hogaboam CM, Kunkel SL. The Chemokine CCL6 Promotes Innate Immunity via Immune Cell Activation and

- Recruitment. *J Immunol.* 2007;179(8):5474-5482. doi:10.4049/jimmunol.179.8.5474
31. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2010;5(1):99-118. doi:10.1146/annurev-pathol-121808-102144
 32. Coppé JP, Patil CK, Rodier F, et al. Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biol.* 2008;6(12):e301. doi:10.1371/journal.pbio.0060301
 33. Cristofalo VJ. SA β Gal staining: Biomarker or delusion. *Exp Gerontol.* 2005;40(10):836-838. doi:10.1016/j.exger.2005.08.005
 34. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2007;1773(8):1358-1375. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.03.010
 35. Cui S, Xue L, Yang F, et al. Postinfarction Hearts Are Protected by Premature Senescent Cardiomyocytes Via GATA4-Dependent Ccn1 Secretion. *J Am Heart Assoc.* 2018;7(18). doi:10.1161/JAHA.118.009111
 36. Dai DF, Chen T, Wanagat J, et al. Age-dependent cardiomyopathy in mitochondrial mutator mice is attenuated by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Aging Cell.* 2010;9(4):536-544. doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00581.x
 37. Dame C. Developmental biology of thrombopoietin in the human fetus and neonate. *Acta Paediatr.* 2007;91:54-65. doi:10.1111/j.1651-2227.2002.tb02906.x
 38. Dang M, Zeng X, Chen B, et al. Soluble receptor for advanced glycation end-products inhibits ischemia/reperfusion-induced myocardial autophagy via the STAT3 pathway. *Free Radic Biol Med.* 2019;130:107-119. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.437
 39. De Andrea M, Ravera R, Gioia D, Gariglio M, Landolfo S. The interferon system: an overview. *Eur J Paediatr Neurol.* 2002;6:A41-A46. doi:10.1053/ejpn.2002.0573
 40. De Cecco M, Ito T, Petrashen AP, et al. L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature.* 2019;566(7742):73-78. doi:10.1038/s41586-018-0784-9
 41. Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc.* 2009;4(12):1798-1806. doi:10.1038/nprot.2009.191
 42. Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, et al. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell.* 2014;31(6):722-733. doi:10.1016/j.devcel.2014.11.012
 43. Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cipl in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 1994;8(21):2540-2551. doi:10.1101/gad.8.21.2540
 44. Di Stefano V, Giacca M, Capogrossi MC, Crescenzi M, Martelli F. Knockdown of Cyclin-dependent Kinase Inhibitors Induces Cardiomyocyte Re-entry in the Cell Cycle. *J Biol Chem.* 2011;286(10):8644-8654. doi:10.1074/jbc.M110.184549
 45. Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;92(20):9363-9367.

doi:10.1073/pnas.92.20.9363

46. Dispersyn GD, Mesotten L, Meuris B, et al. Dissociation of cardiomyocyte apoptosis and dedifferentiation in infarct border zones. *Eur Heart J.* 2002;23(11):849-857. doi:10.1053/euhj.2001.2963
47. Drenckhahn JD, Schwarz QP, Gray S, et al. Compensatory Growth of Healthy Cardiac Cells in the Presence of Diseased Cells Restores Tissue Homeostasis during Heart Development. *Dev Cell.* 2008;15(4):521-533. doi:10.1016/j.devcel.2008.09.005
48. Drenckhahn JD, Strasen J, Heinecke K, et al. Impaired myocardial development resulting in neonatal cardiac hypoplasia alters postnatal growth and stress response in the heart. *Cardiovasc Res.* 2015;106(1):43-54. doi:10.1093/cvr/cvv028
49. Engel FB, Schebesta M, Duong MT, et al. p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev.* 2005;19(10):1175-1187. doi:10.1101/gad.1306705
50. Eschenhagen T, Bolli R, Braun T, et al. Cardiomyocyte Regeneration: A Consensus Statement. *Circulation.* 2017;136(7):680-686. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029343
51. Evangelou K, Bramis* J, Peros I, et al. Electron microscopy evidence that cytoplasmic localization of the p16^{INK4A} “nuclear” cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) in tumor cells is specific and not an artifact. A study in non-small cell lung carcinomas. *Biotech Histochem.* 2004;79(1):5-10. doi:10.1080/10520290310001659466
52. Fagagna F d'Adda di, Reaper PM, Clay-Farrace L, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature.* 2003;426(6963):194. doi:10.1038/nature02118
53. Faget L, Hnasko TS. Tyramide Signal Amplification for Immunofluorescent Enhancement. In: Hnasko R, ed. *ELISA*. Vol 1318. Methods in Molecular Biology. Springer New York; 2015:161-172. doi:10.1007/978-1-4939-2742-5_16
54. Fang Y, Gupta V, Karra R, Holdway JE, Kikuchi K, Poss KD. Translational profiling of cardiomyocytes identifies an early Jak1/Stat3 injury response required for zebrafish heart regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(33):13416-13421. doi:10.1073/pnas.1309810110
55. Feng Teng, Meng Jufeng, Kou Shan, et al. CCN1-Induced Cellular Senescence Promotes Heart Regeneration. *Circulation.* 2019;139(21):2495-2498. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.039530
56. Franceschi C, Campisi J. Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *J Gerontol Ser A.* 2014;69(Suppl_1):S4-S9. doi:10.1093/gerona/glu057
57. Freeman GJ, Casasnovas JM, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2010;235(1):172-189. doi:10.1111/j.0105-2896.2010.00903.x
58. Freund A, Orjalo AV, Desprez PY, Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med.* 2010;16(5):238-246. doi:10.1016/j.molmed.2010.03.003

59. Freund A, Patil CK, Campisi J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J*. 2011;30(8):1536-1548. doi:10.1038/emboj.2011.69
60. Freund C, Schmidt-Ullrich R, Baurand A, et al. Requirement of nuclear factor-kappaB in angiotensin II- and isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in vivo. *Circulation*. 2005;111(18):2319-2325. doi:10.1161/01.CIR.0000164237.58200.5A
61. Georgakilas AG, Martin OA, Bonner WM. p21: A Two-Faced Genome Guardian. *Trends Mol Med*. 2017;23(4):310-319. doi:10.1016/J.MOLMED.2017.02.001
62. Haghikia A, Ricke-Hoch M, Stapel B, Gorst I, Hilfiker-Kleiner D. STAT3, a key regulator of cell-to-cell communication in the heart. *Cardiovasc Res*. 2014;102(2):281-289. doi:10.1093/cvr/cvu034
63. Haghikia A, Stapel B, Hoch M, Hilfiker-Kleiner D. STAT3 and cardiac remodeling. *Heart Fail Rev*. 2011;16(1):35-47. doi:10.1007/s10741-010-9170-x
64. Haller F, Agaimy A, Cameron S, et al. Expression of p16^{INK4A} in gastrointestinal stromal tumours (GISTs): two different forms exist that independently correlate with poor prognosis. *Histopathology*. 2010;56(3):305-318. doi:10.1111/j.1365-2559.2010.03478.x
65. Han C, Nie Y, Lian H, et al. Acute inflammation stimulates a regenerative response in the neonatal mouse heart. *Cell Res*. 2015;25(10):1137-1151. doi:10.1038/cr.2015.110
66. Han WK, Alinani A, Wu CL, et al. Human Kidney Injury Molecule-1 Is a Tissue and Urinary Tumor Marker of Renal Cell Carcinoma. *J Am Soc Nephrol*. Published online 2005:9.
67. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK - a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(4):251-262. doi:10.1038/nrm3311
68. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 1990;345(6274):458. doi:10.1038/345458a0
69. Hauck L, Harms C, Grothe D, et al. Critical role for FoxO3a-dependent regulation of p21CIP1/WAF1 in response to statin signaling in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2007;100(1):50-60. doi:10.1161/01.RES.0000254704.92532.b9
70. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961;25(3):585-621. doi:10.1016/0014-4827(61)90192-6
71. Hennig M. The role of the mTOR pathway and amino acid availability for pre- and postnatal cardiac development, growth and function. Published online June 26, 2015. doi:10.18452/17287
72. Herranz N, Gil J. Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest*. 2018;128(4):1238-1246. doi:10.1172/JCI95148
73. Higo T, Naito AT, Sumida T, et al. DNA single-strand break-induced DNA damage response causes heart failure. *Nat Commun*. 2017;8:15104. doi:10.1038/ncomms15104
74. Hitchcock IS, Kaushansky K. Thrombopoietin from beginning to end. *Br J Haematol*. 2014;165(2):259-268. doi:10.1111/bjh.12772
75. Hu H, Nan J, Sun Y, et al. Electron leak from NDUFA13 within mitochondrial complex I attenuates ischemia-reperfusion injury via dimerized STAT3. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A*. 2017;114(45):11908-11913. doi:10.1073/pnas.1704723114
76. Jafari M, Ansari-Pour N. Why, When and How to Adjust Your P Values? *Cell J Yakhteh*. 2019;20(4):604-607. doi:10.22074/cellj.2019.5992
 77. Jenkins NC, Liu T, Cassidy P, et al. The p16INK4A tumor suppressor regulates cellular oxidative stress. *Oncogene*. 2011;30(3):265-274. doi:10.1038/onc.2010.419
 78. Jesus BBD, Blasco MA. Assessing Cell and Organ Senescence Biomarkers. 2016;111(1):97-109. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.247866.Assessing
 79. Johnson B, VanBlargan LA, Xu W, et al. Human IFIT3 Modulates IFIT1 RNA Binding Specificity and Protein Stability. *Immunity*. 2018;48(3):487-499.e5. doi:10.1016/j.immuni.2018.01.014
 80. Johnson P, Maxwell DJ, Tynan MJ, Allan LD. Intracardiac pressures in the human fetus. *Heart*. 2000;84(1):59-63. doi:10.1136/heart.84.1.59
 81. Jones RG, Plas DR, Kubek S, et al. AMP-Activated Protein Kinase Induces a p53-Dependent Metabolic Checkpoint. *Mol Cell*. 2005;18(3):283-293. doi:10.1016/j.molcel.2005.03.027
 82. Jopling C, Suñe G, Morera C, Izpisua Belmonte JC. p38 α MAPK regulates myocardial regeneration in zebrafish. *Cell Cycle Georget Tex*. 2012;11(6):1195-1201. doi:10.4161/cc.11.6.19637
 83. Jun JI, Lau LF. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat Cell Biol*. 2010;12(7):676-685. doi:10.1038/ncb2070
 84. Kang TW, Yevsa T, Woller N, et al. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*. 2011;479(7374):547-551. doi:10.1038/nature10599
 85. Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair*. 2016;42:63-71. doi:10.1016/j.dnarep.2016.04.008
 86. Karra R, Poss KD. Redirecting cardiac growth mechanisms for therapeutic regeneration. *J Clin Invest*. 2017;127(2):427-436. doi:10.1172/JCI89786
 87. Kasthuber ER, Lowe SW. Putting p53 in Context. *Cell*. 2017;170(6):1062-1078. doi:10.1016/j.cell.2017.08.028
 88. Kaushansky K. Thrombopoiesis. *Semin Hematol*. 2015;52(1):4-11. doi:10.1053/j.seminhematol.2014.10.003
 89. Kierdorf K, Fritz G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *J Leukoc Biol*. 2013;94(1):55-68. doi:10.1189/jlb.1012519
 90. Kim KS, Kang KW, Seu YB, Baek SH, Kim JR. Interferon- γ induces cellular senescence through p53-dependent DNA damage signaling in human endothelial cells. *Mech Ageing Dev*. 2009;130(3):179-188. doi:10.1016/J.MAD.2008.11.004
 91. Kojima H, Inoue T, Kunimoto H, Nakajima K. IL-6-STAT3 signaling and premature senescence. *JAK-STAT*. 2013;2(4):e25763. doi:10.4161/jkst.25763
 92. Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, et al. Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell*. 2008;134(4):657-667. doi:10.1016/j.cell.2008.06.049
 93. Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging.

- Proc Natl Acad Sci.* 2001;98(21):12072-12077. doi:10.1073/pnas.211053698
94. Kubin T, Pöling J, Kostin S, et al. Oncostatin M Is a Major Mediator of Cardiomyocyte Dedifferentiation and Remodeling. *Cell Stem Cell.* 2011;9(5):420-432. doi:10.1016/j.stem.2011.08.013
 95. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev.* 2010;24(22):2463-2479. doi:10.1101/gad.1971610
 96. Kuo LJ, Yang LX. γ -H2AX - A Novel Biomarker for DNA Double-strand Breaks. *In Vivo.* 2008;22(3):305-309.
 97. Laflamme MA, Murry CE. Heart regeneration. *Nature.* 2011;473(7347):326-335. doi:10.1038/nature10147
 98. Lai L, Shin GY, Qiu H. The Role of Cell Cycle Regulators in Cell Survival—Dual Functions of Cyclin-Dependent Kinase 20 and p21Cip1/Waf1. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):8504. doi:10.3390/ijms21228504
 99. Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992;358(6381):15. doi:10.1038/358015a0
 100. Lavine KJ, Epelman S, Uchida K, et al. Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(45):16029-16034. doi:10.1073/pnas.1406508111
 101. Levick SP, Goldspink PH. Could interferon-gamma be a therapeutic target for treating heart failure? *Heart Fail Rev.* 2014;19(2):227-236. doi:10.1007/s10741-013-9393-8
 102. Li J, Xia Y, Kuter DJ. Interaction of thrombopoietin with the platelet c-mpl receptor in plasma: binding, internalization, stability and pharmacokinetics: Interaction of Thrombopoietin with Platelet c-mpl Receptor. *Br J Haematol.* 1999;106(2):345-356. doi:10.1046/j.1365-2141.1999.01571.x
 103. Li K, Sung RYT, Huang WZ, et al. Thrombopoietin Protects Against In Vitro and In Vivo Cardiotoxicity Induced by Doxorubicin. *Circulation.* 2006;113(18):2211-2220. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.560250
 104. Liesenfeld O, Parvanova I, Zerrahn J, et al. The IFN- γ -inducible GTPase, Irga6, protects mice against *Toxoplasma gondii* but not against *Plasmodium berghei* and some other intracellular pathogens. *PLoS One.* 2011;6(6):e20568. doi:10.1371/journal.pone.0020568
 105. Lim S, Lee ME, Jeong J, et al. sRAGE attenuates angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy by inhibiting RAGE-NF κ B-NLRP3 activation. *Inflamm Res.* 2018;67(8):691-701. doi:10.1007/s00011-018-1160-9
 106. Lints TJ, Parsons LM, Hartley L, Lyons I, Harvey RP. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development.* 1993;119(2):419-431.
 107. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods.* 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
 108. Loonstra A, Vooijs M, Beverloo HB, et al. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(16):9209-9214. doi:10.1073/pnas.161269798

109. Lorda-Diez CI, Solis-Mancilla ME, Sanchez-Fernandez C, Garcia-Porrero JA, Hurle JM, Montero JA. Cell senescence, apoptosis and DNA damage cooperate in the remodeling processes accounting for heart morphogenesis. *J Anat.* 2019;234(6):815-829. doi:10.1111/joa.12972
110. Magarin M, Pohl T, Lill A, et al. Embryonic cardiomyocytes can orchestrate various cell protective mechanisms to survive mitochondrial stress. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;97:1-14. doi:10.1016/j.yjmcc.2016.04.007
111. Magarin M, Schulz H, Thierfelder L, Drenckhahn JD. Transcriptional profiling of regenerating embryonic mouse hearts. *Genomics Data.* 2016;9:145-147. doi:10.1016/j.gdata.2016.08.009
112. Malaquin N, Martinez A, Rodier F. Keeping the senescence secretome under control: Molecular reins on the senescence-associated secretory phenotype. *Exp Gerontol.* 2016;82:39-49. doi:10.1016/j.exger.2016.05.010
113. Marcotte R, Lacelle C, Wang E. Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3. *Mech Ageing Dev.* 2004;125(10):777-783. doi:10.1016/j.mad.2004.07.007
114. Mastellos D, DeAngelis RA, Lambris JD. Complement-triggered pathways orchestrate regenerative responses throughout phylogenesis. *Semin Immunol.* 2013;25(1):29-38. doi:10.1016/j.smim.2013.04.002
115. Mastellos D, Lambris JD. Complement: more than a “guard” against invading pathogens? *Trends Immunol.* 2002;23(10):485-491. doi:10.1016/s1471-4906(02)02287-1
116. Mastellos D, Papadimitriou JC, Franchini S, Tsonis PA, Lambris JD. A Novel Role of Complement: Mice Deficient in the Fifth Component of Complement (C5) Exhibit Impaired Liver Regeneration. *J Immunol.* 2001;166(4):2479-2486. doi:10.4049/jimmunol.166.4.2479
117. Mathers C., Stevens GA, Mahanani W.R., Fat DM, Hogan D. WHO | Disease burden and mortality estimates. *Who.* 2018;(March):1-65. doi:2013
118. McLellan MA, Rosenthal NA, Pinto AR. Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2017;7(1):1-12. doi:10.1002/cpmo.22
119. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature.* 2000;407(6805):796-801. doi:10.1038/35037734
120. Meijles DN, Zoumpoulidou G, Markou T, et al. The cardiomyocyte “redox rheostat”: Redox signalling via the AMPK-mTOR axis and regulation of gene and protein expression balancing survival and death. *J Mol Cell Cardiol.* 2019;129:118-129. doi:10.1016/j.yjmcc.2019.02.006
121. Melk A, Kittikowit W, Sandhu I, et al. Cell senescence in rat kidneys in vivo increases with growth and age despite lack of telomere shortening. *Kidney Int.* 2003;63(6):2134-2143. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00032.x
122. Meyer K, Hodwin B, Ramanujam D, Engelhardt S, Sarikas A. Essential Role for Premature Senescence of Myofibroblasts in Myocardial Fibrosis. *J Am Coll Cardiol.* 2016;67(17):2018-2028. doi:10.1016/j.jacc.2016.02.047
123. Micco RD, Fumagalli M, Cicalese A, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature.*

- 2006;444(7119):638. doi:10.1038/nature05327
124. Miyawaki A, Obana M, Mitsuhashi Y, et al. Adult murine cardiomyocytes exhibit regenerative activity with cell cycle reentry through STAT3 in the healing process of myocarditis. *Sci Rep*. 2017;7(1):1407. doi:10.1038/s41598-017-01426-8
 125. Moiseeva O, Bourdeau V, Roux A, Deschenes-Simard X, Ferbeyre G. Mitochondrial Dysfunction Contributes to Oncogene-Induced Senescence. *Mol Cell Biol*. 2009;29(16):4495-4507. doi:10.1128/MCB.01868-08
 126. Muñoz-Espín D, Cañamero M, Maraver A, et al. Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development. *Cell*. 2013;155(5):1104-1118. doi:10.1016/j.cell.2013.10.019
 127. Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(7):482-496. doi:10.1038/nrm3823
 128. Nakamura M, Ohsawa S, Igaki T. Mitochondrial defects trigger proliferation of neighbouring cells via a senescence-associated secretory phenotype in *Drosophila*. *Nat Commun*. 2014;5:1-11. doi:10.1038/ncomms6264
 129. Natarajan N, Abbas Y, Bryant DM, et al. Complement Receptor C5aR1 Plays an Evolutionarily Conserved Role in Successful Cardiac Regeneration. *Circulation*. 2018;137(20):2152-2165. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030801
 130. Negoro S, Kunisada K, Fujio Y, et al. Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Protects Cardiomyocytes from Hypoxia/Reoxygenation-Induced Oxidative Stress Through the Upregulation of Manganese Superoxide Dismutase. *Circulation*. 2001;104(9):979-981. doi:10.1161/hc3401.095947
 131. Nilsson K, Landberg G. Subcellular localization, modification and protein complex formation of the cdk-inhibitor p16 in Rb-functional and Rb-inactivated tumor cells. *Int J Cancer*. 2006;118(5):1120-1125. doi:10.1002/ijc.21466
 132. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF- κ B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(4):a000034-a000034. doi:10.1101/cshperspect.a000034
 133. Pan ZQ, Reardon JT, Li L, et al. Inhibition of Nucleotide Excision Repair by the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p21. *J Biol Chem*. 1995;270(37):22008-22016. doi:10.1074/jbc.270.37.22008
 134. Papaconstantinou J, Hsieh CC. Activation of senescence and aging characteristics by mitochondrially generated ROS: How are they linked? *Cell Cycle*. 2010;9(19):3831-3833. doi:10.4161/cc.9.19.13324
 135. Pazarentzos E, Mahul-Mellier A, Datler C, et al. I κ B α inhibits apoptosis at the outer mitochondrial membrane independently of NF- κ B retention. *EMBO J*. 2014;33(23):2814-2828. doi:10.15252/embj.201488183
 136. Pépin G, Ferrand J, Höning K, et al. Cre-dependent DNA recombination activates a STING-dependent innate immune response. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(11):5356-5364. doi:10.1093/nar/gkw405
 137. Pinto Alexander R., Ilinykh Alexei, Ivey Malina J., et al. Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res*. 2016;118(3):400-409. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.307778
 138. Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish. *Science*. 2002;298(5601):2188-2190. doi:10.1126/science.1077857

139. Rajabi M, Kassiotis C, Razeghi P, Taegtmeier H. Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis. *Heart Fail Rev.* 2007;12(3):331-343. doi:10.1007/s10741-007-9034-1
140. Reinecke Hans, Zhang Ming, Bartosek Trudy, Murry Charles E. Survival, Integration, and Differentiation of Cardiomyocyte Grafts. *Circulation.* 1999;100(2):193-202. doi:10.1161/01.CIR.100.2.193
141. Ritschka B, Storer M, Mas A, et al. The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes Dev.* 2017;31(2):172-183. doi:10.1101/gad.290635.116
142. Robles SJ, Adami GR. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16 INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene.* 1998;16(9):1113. doi:10.1038/sj.onc.1201862
143. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol.* 2011;192(4):547-556. doi:10.1083/jcb.201009094
144. Rose-John S. Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10(2). doi:10.1101/cshperspect.a028415
145. Rosenberg M, Lutz M, Kühl C, et al. Coculture with hematopoietic stem cells protects cardiomyocytes against apoptosis via paracrine activation of AKT. *J Transl Med.* 2012;10(1):115. doi:10.1186/1479-5876-10-115
146. Salminen A, Kauppinen A, Kaarniranta K. Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cell Signal.* 2012;24(4):835-845. doi:10.1016/j.cellsig.2011.12.006
147. Sanders YY, Liu H, Zhang X, et al. Histone Modifications in Senescence-Associated Resistance to Apoptosis by Oxidative Stress. *Redox Biol.* 2013;1(1):8-16. doi:10.1016/j.redox.2012.11.004
148. Saraste M. Oxidative Phosphorylation at the fin de siècle. *Science.* 1999;283(5407):1488-1493. doi:10.1126/science.283.5407.1488
149. Sarig Rachel, Rimmer Rachel, Bassat Elad, et al. Transient p53-Mediated Regenerative Senescence in the Injured Heart. *Circulation.* 2019;139(21):2491-2494. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.040125
150. Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(14):5166-5170.
151. Sawicka M, Pawlikowski J, Wilson S, et al. The Specificity and Patterns of Staining in Human Cells and Tissues of p16INK4a Antibodies Demonstrate Variant Antigen Binding. *PLoS ONE.* 2013;8(1). doi:10.1371/journal.pone.0053313
152. Schmitz ML, Kracht M. Cyclin-Dependent Kinases as Coregulators of Inflammatory Gene Expression. *Trends Pharmacol Sci.* 2016;37(2):101-113. doi:10.1016/j.tips.2015.10.004
153. Schweigert O, Dewitz C, Möller-Hackbarth K, et al. Soluble T cell immunoglobulin and mucin domain (TIM)-1 and -4 generated by A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM)-10 and -17 bind to phosphatidylserine. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1843(2):275-287. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.11.014
154. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature.* 1993;366(6456):704.

doi:10.1038/366704a0

155. Shang L, Ananthakrishnan R, Li Q, et al. RAGE Modulates Hypoxia/Reoxygenation Injury in Adult Murine Cardiomyocytes via JNK and GSK-3 β Signaling Pathways. *PLoS ONE*. 2010;5(4):e10092. doi:10.1371/journal.pone.0010092
156. Sharpless NE, Sherr CJ. Forging a signature of in vivo senescence. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(7):397-408. doi:10.1038/nrc3960
157. Shibamoto M, Higo T, Naito AT, et al. Activation of DNA Damage Response and Cellular Senescence in Cardiac Fibroblasts Limit Cardiac Fibrosis After Myocardial Infarction. *Int Heart J*. 2019;60(4):944-957. doi:10.1536/ihj.18-701
158. Shimizu I, Minamino T. Cellular senescence in cardiac diseases. *J Cardiol*. Published online June 12, 2019. doi:10.1016/j.jjcc.2019.05.002
159. Siddiqi S, Sussman MA. Cardiac Hegemony of Senescence. *Curr Transl Geriatr Exp Gerontol Rep*. 2013;2(4):247-254. doi:10.1007/s13670-013-0064-3
160. Smeitink J, Heuvel L van den, DiMauro S. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat Rev Genet*. 2001;2(5):342. doi:10.1038/35072063
161. Sohal DS, Nghiem M, Crackower MA, et al. Temporally Regulated and Tissue-Specific Gene Manipulations in the Adult and Embryonic Heart Using a Tamoxifen-Inducible Cre Protein. *Circ Res*. 2001;89(1):20-25. doi:10.1161/hh1301.092687
162. Sola MC, Juul SE, Meng YG, et al. Thrombopoietin (Tpo) in the fetus and neonate: Tpo concentrations in preterm and term neonates, and organ distribution of Tpo and its receptor (c-mpl) during human fetal development. *Early Hum Dev*. 1999;53(3):239-250. doi:10.1016/S0378-3782(98)00077-2
163. Stanley EG, Biben C, Elefanty A, et al. Efficient Cre-mediated deletion in cardiac progenitor cells conferred by a 3'UTR-ires-Cre allele of the homeobox gene Nkx2-5. *Int J Dev Biol*. 2004;46(4):431-439. doi:10.1387/ijdb.12141429
164. Stat1 Antibody. Cell Signaling Technology. Accessed February 7, 2021. www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/stat1-antibody/9172
165. Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland. *Wirtsch Stat*. 2017;Fachserie(Reihe 4):1-44. doi:2120400107004
166. Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulić V. Differential Roles for Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors p21 and p16 in the Mechanisms of Senescence and Differentiation in Human Fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 1999;19(3):2109-2117. doi:10.1128/MCB.19.3.2109
167. Storer M, Mas A, Robert-Moreno A, et al. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell*. 2013;155(5):1119-1130. doi:10.1016/j.cell.2013.10.041
168. Sungaran R, Chisholm OT, Markovic B, Khachigian LM, Tanaka Y, Chong BH. The role of platelet α -granular proteins in the regulation of thrombopoietin messenger RNA expression in human bone marrow stromal cells. *Blood*. 2000;95(10):3094-3101. doi:10.1182/blood.V95.10.3094.009k05_3094_3101
169. SYBR® Green Based Quantitative PCR. Sigma-Aldrich. Accessed March 14, 2021. <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/pcr/quantitative-pcr/sybr-green-based-qpcr.html>
170. Taegtmeier H, Sen S, Vela D. Return to the fetal gene program: A suggested metabolic link to gene expression in the heart. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1188(1):191-

198. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05100.x
171. Takaoka A, Yanai H. Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol.* 2006;8(6):907-922. doi:https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00716.x
172. Tane S, Ikenishi A, Okayama H, Iwamoto N, Nakayama KI, Takeuchi T. CDK inhibitors, p21(Cip1) and p27(Kip1), participate in cell cycle exit of mammalian cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;443(3):1105-1109. doi:10.1016/j.bbrc.2013.12.109
173. Tang P, Ma S, Dong M, et al. Effect of interleukin-6 on myocardial regeneration in mice after cardiac injury. *Biomed Pharmacother.* 2018;106:303-308. doi:10.1016/j.biopha.2018.06.090
174. Tyagi E, Liu B, Li C, Liu T, Rutter J, Grossman D. Loss of p16INK4A stimulates aberrant mitochondrial biogenesis through a CDK4/Rb-independent pathway. *Oncotarget.* 2017;8(34):55848-55862. doi:10.18632/oncotarget.19862
175. Tzahor E, Poss KD. Cardiac regeneration strategies: Staying young at heart. *Science.* 2017;356(6342):1035-1039. doi:10.1126/science.aam5894
176. Uthaiyah RC, Praefcke GJK, Howard JC, Herrmann C. IIGP1, an Interferon- γ -inducible 47-kDa GTPase of the Mouse, Showing Cooperative Enzymatic Activity and GTP-dependent Multimerization. *J Biol Chem.* 2003;278(31):29336-29343. doi:10.1074/jbc.M211973200
177. Vaughan S, Jat PS. Deciphering the role of Nuclear Factor- κ B in cellular senescence. *Aging.* 2011;3(10):913-919.
178. Velarde MC, Flynn JM, Day NU, Melov S, Campisi J. Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin. *Aging.* 2012;4(1):3-12. doi:10.18632/aging.100423
179. Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation.* 2020;141(9). doi:10.1161/CIR.0000000000000757
180. Volland C, Schott P, Didié M, et al. Control of p21Cip by BRCA1-associated protein is critical for cardiomyocyte cell cycle progression and survival. *Cardiovasc Res.* 2020;116(3):592-604. doi:10.1093/cvr/cvz177
181. Wang E. Senescent Human Fibroblasts Resist Programmed Cell Death, and Failure to Suppress bcl2 Is Involved. *Cancer Res.* 1995;55(11):2284-2292.
182. Wang S, Zhou M, Lin F, et al. Interferon- γ Induces Senescence in Normal Human Melanocytes. Kim AL, ed. *PLoS ONE.* 2014;9(3):e93232. doi:10.1371/journal.pone.0093232
183. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell.* 1995;81(3):323-330. doi:10.1016/0092-8674(95)90385-2
184. Wiley CD, Velarde MC, Lecot P, et al. Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. 2015;23(2):303-314. doi:10.1016/j.cmet.2015.11.011.Mitochondrial
185. Williams AB, Schumacher B. p53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(5):a026070. doi:10.1101/cshperspect.a026070
186. Wu Z, Oeck S, West AP, et al. Mitochondrial DNA stress signalling protects the nuclear genome. *Nat Metab.* 2019;1(12):1209-1218. doi:10.1038/s42255-019-

0150-8

187. Xiang Y, Liao XH, Li JP, et al. Myocardin and Stat3 act synergistically to inhibit cardiomyocyte apoptosis. *Oncotarget*. 2017;8(59):99612-99623. doi:10.18632/oncotarget.20450
188. Xu M, Tchkonina T, Ding H, et al. JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. *Proc Natl Acad Sci*. Published online 2015. doi:10.1073/pnas.1515386112
189. Xu M, Wan C xia, Huang S hui, et al. Oridonin protects against cardiac hypertrophy by promoting P21-related autophagy. *Cell Death Dis*. 2019;10(6):403. doi:10.1038/s41419-019-1617-y
190. Xue W, Zender L, Miething C, et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*. 2007;445(7128):656-660. doi:10.1038/nature05529
191. Yao X, Carlson D, Sun Y, et al. Mitochondrial ROS Induces Cardiac Inflammation via a Pathway through mtDNA Damage in a Pneumonia-Related Sepsis Model. *PLoS ONE*. 2015;10(10). doi:10.1371/journal.pone.0139416
192. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13:134. doi:10.1186/1471-2105-13-134
193. Yeo EJ, Hwang YC, Kang CM, Choy HE, Park SC. Reduction of UV-induced cell death in the human senescent fibroblasts. *Mol Cells*. 2000;10(4):415-422.
194. Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, et al. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature*. 2013;499(7456):97-101. doi:10.1038/nature12347
195. Young D, Popovic ZB, Jones WK, Gupta S. Blockade of NF-kappaB using IkappaB alpha dominant-negative mice ameliorates cardiac hypertrophy in myotrophin-overexpressed transgenic mice. *J Mol Biol*. 2008;381(3):559-568. doi:10.1016/j.jmb.2008.05.076
196. Yu Q, Katlinskaya YV, Carbone CJ, et al. DNA-Damage-Induced Type I Interferon Promotes Senescence and Inhibits Stem Cell Function. *Cell Rep*. 2015;11(5):785-797. doi:10.1016/j.celrep.2015.03.069
197. Zelarayan L, Renger A, Noack C, et al. NF-kappaB activation is required for adaptive cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2009;84(3):416-424. doi:10.1093/cvr/cvp237
198. Zhang L, Yang X, Jiang G, et al. HMGB1 enhances mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy in vitro via the RAGE/ERK1/2 signaling pathway. *Int J Mol Med*. 2019;44(3):885-892. doi:10.3892/ijmm.2019.4276
199. Zheng Y, Wang L, Chen M, et al. Inhibition of T cell immunoglobulin and mucin-1 (TIM-1) protects against cerebral ischemia-reperfusion injury. *Cell Commun Signal*. 2019;17(1):103. doi:10.1186/s12964-019-0417-4

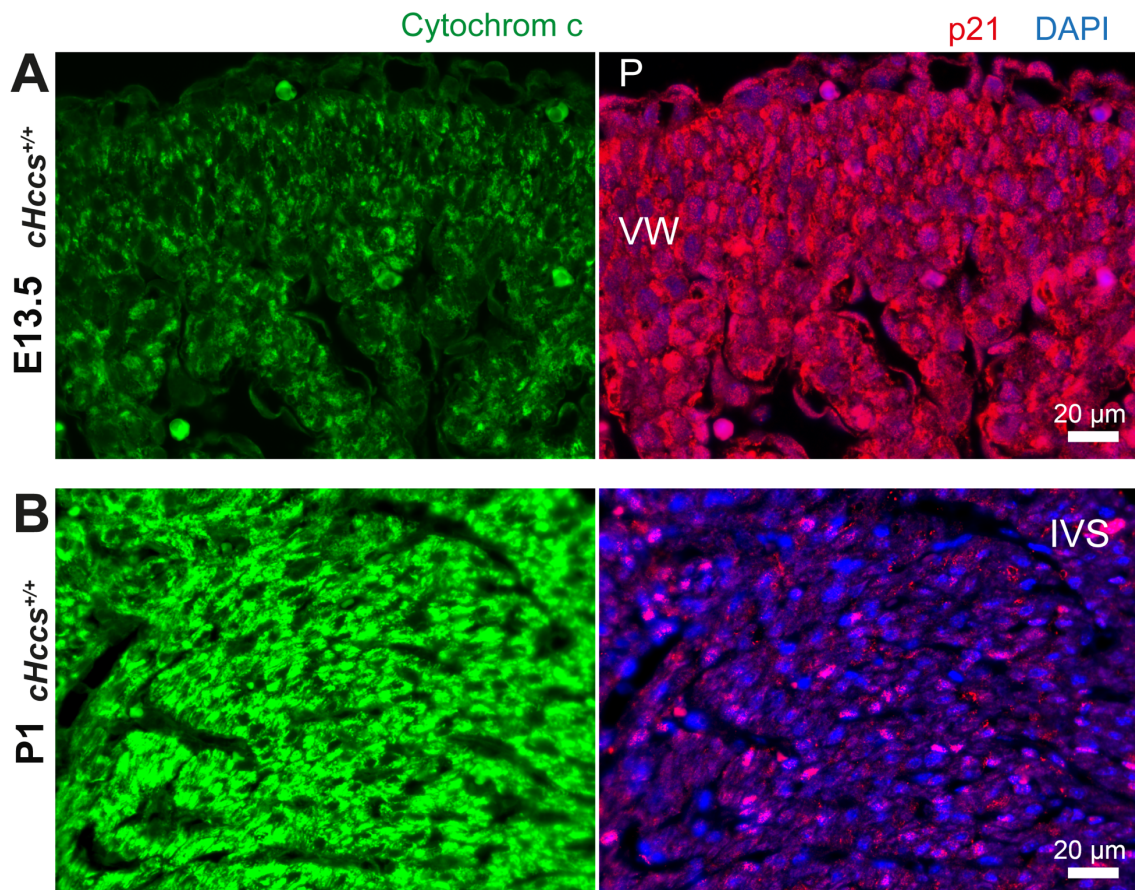
Anhang

Anhang 1: Tabellarische Darstellung der Auswertung des Zytokin-Protein-Arrays

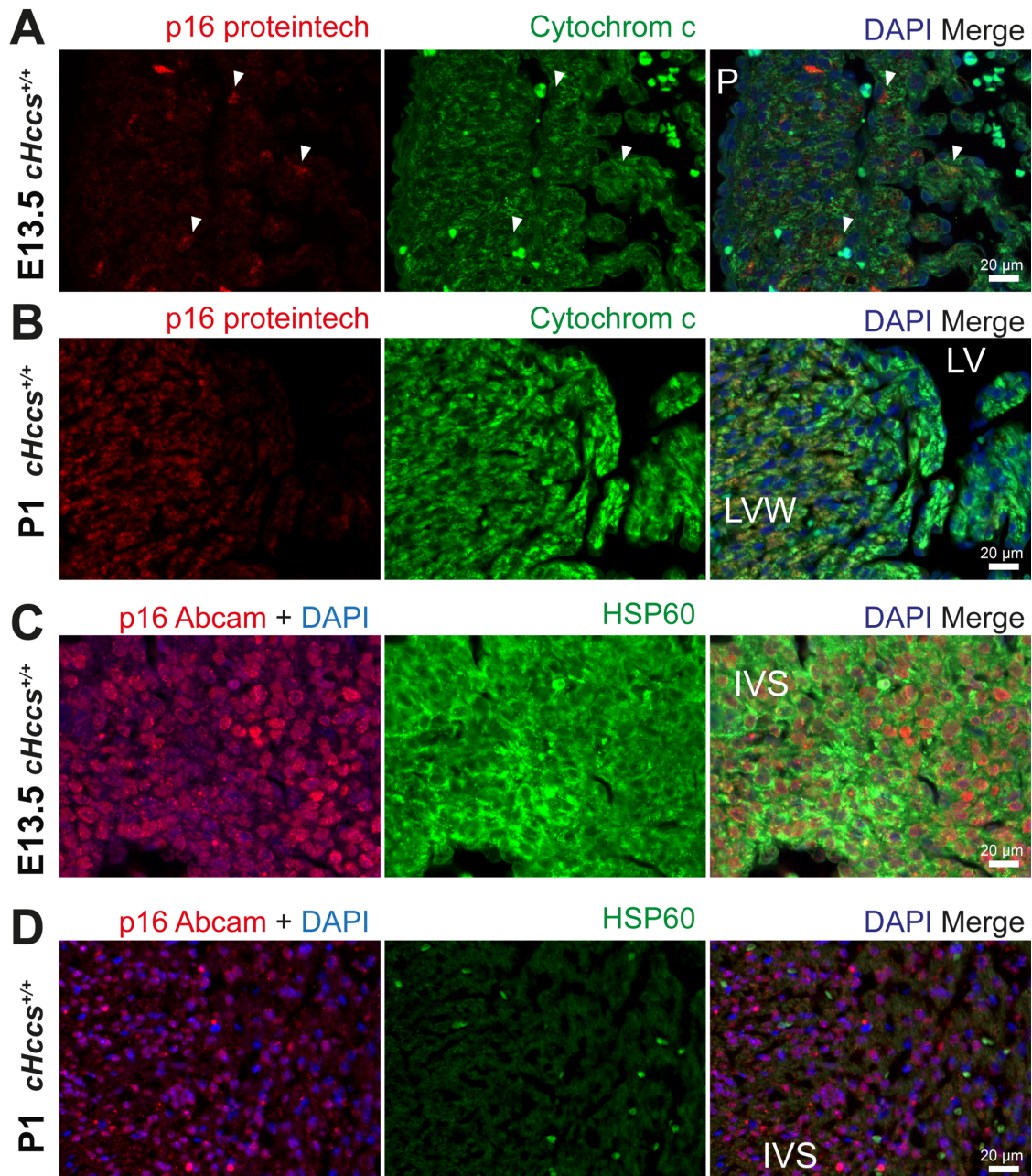
Zytokine	Entrez Gene ID	fold change	p-Wert	q-Wert
Adiponectin/Acrp30	11450	0,9894	0,8786	0,953866
Amphiregulin	11839	0,9171	0,455231	0,873183
Angiopoietin-1	11600	1,03	0,77566	0,896487
Angiopoietin-2	11601	0,8748	0,490546	0,873183
Angiopoietin-like 3	30924	0,8025	0,21346	0,873183
BAFF/BLYS/TNFSF13B	24099	1,099	0,49679	0,873183
CD1q R1/CD93	17064	0,9548	0,66559	0,873183
CCL2/JE/MCP-1	20296	1,167	0,28577	0,873183
CCL3/CCL4 MIP-1 alpha/beta	20302/20303	0,8897	0,536392	0,873183
CCL5/RANTES	20304	0,9103	0,743102	0,896487
CCL6/C10	20305	1,819	0,014847	0,796349
CCL11/Eotaxin	20292	1,27	0,085987	0,873183
CCL12/MCP-5	20293	0,9197	0,526676	0,873183
CCL17/TARC	20295	1,113	0,234368	0,873183
CCL19/MIP-3 beta	24047	0,9487	0,700977	0,873183
CCL20/MIP-3 alpha	20297	0,8275	0,359283	0,873183
CCL21/6Ckine	18829	0,9137	0,61214	0,873183
CCL22/MDC	20299	0,8419	0,312917	0,873183
CD14	12475	0,8564	0,416254	0,873183
CD40/TNFRSF5	21939	0,9597	0,76785	0,896487
CD160	54215	1,076	0,555854	0,873183
Chemerin	71660	0,8788	0,127848	0,873183
Chitinase 3-like 1	12654	0,9917	0,92482	0,960625
Coagulation Factor III/Tissue Factor	14066	0,8736	0,464	0,873183
Complement Component C5/C5a	15139	1,208	0,010678	0,796349
Complement Factor D	11537	1,022	0,852463	0,952226
C-Reactive Protein/CRP	12944	0,9581	0,760752	0,896487
CX3CL1/Fractalkine	20312	0,9014	0,445415	0,873183
CXCL1/KC	14825	0,9496	0,745575	0,896487
CXCL2/MIP-2	20310	0,9329	0,677455	0,873183
CXCL9/MIG	17329	0,9655	0,674095	0,873183
CXCL10/IP-10	15945	0,9259	0,600198	0,873183
CXCL11/I-TAC	56066	1,032	0,813923	0,931112
CXCL13/BLC/BCA-1	55985	1,062	0,576603	0,873183
CXCL16	66102	1,008	0,928595	0,960625
Cystatin C	13010	1,026	0,648095	0,873183
Dkk-1	13380	1,003	0,983801	0,993639
DPPIV/CD26	13482	0,9118	0,375408	0,873183
EGF	13645	1,104	0,654353	0,873183
Endoglin/CD105	13805	1,061	0,456339	0,873183
Endostatin	12822	1,113	0,310116	0,873183
Fetuin A/AHSG	11625	1,159	0,210987	0,873183
FGF acidic	14164	0,9658	0,665247	0,873183
FGF-21	56636	1,031	0,834766	0,945309
Flt-3 Ligand	14256	1,062	0,566293	0,873183
Gas6	14456	1,009	0,884864	0,953866
G-CSF	12985	1,062	0,59067	0,873183
GDF-15	23886	1,077	0,260357	0,873183
GM-CSF	12981	1,314	0,121574	0,873183
HGF	15234	1,014	0,92877	0,960625
ICAM-1/CD54	15894	0,9787	0,863215	0,952226
IFN-gamma	15978	1,156	0,306499	0,873183

Zytokine	Entrez Gene ID	fold change	p-Wert	q-Wert
IGFBP-1	16006	1,203	0,249213	0,873183
IGFBP-2	16008	1,23	0,296775	0,873183
IGFBP-3	16009	1,114	0,218957	0,873183
IGFBP-5	16011	0,9308	0,658136	0,873183
IGFBP-6	16012	0,9716	0,69843	0,873183
IL-1 alpha/IL1F1	16175	0,9273	0,472569	0,873183
IL-1 beta/IL-1F2	16176	0,9561	0,670087	0,873183
IL-1ra/IL-1F3	16181	0,9576	0,661727	0,873183
IL-2	16183	1,13	0,54245	0,873183
IL-3	16187	1,246	0,343783	0,873183
IL-4	16189	0,9188	0,607512	0,873183
IL-5	16191	0,9354	0,590927	0,873183
IL-6	16193	1,237	0,252393	0,873183
IL-7	16196	1,107	0,523175	0,873183
IL-10	16153	0,9201	0,555532	0,873183
IL-11	16156	0,952	0,689002	0,873183
IL-12p40	16160	0,9121	0,381914	0,873183
IL-13	16163	0,9182	0,415561	0,873183
IL-15	16168	0,7923	0,085258	0,873183
IL-17A	16171	1,263	0,181649	0,873183
IL-22	50929	0,981	0,866355	0,952226
IL-23	83430	0,9859	0,912381	0,960625
IL-27 p28	246779	1,053	0,579202	0,873183
IL-28A/B	330496/338374	1,155	0,179532	0,873183
IL-33	77125	1,121	0,148165	0,873183
LDL R	16835	1,089	0,496502	0,873183
Leptin	16846	0,9095	0,632971	0,873183
LIF	16878	0,8629	0,430726	0,873183
Lipocalin-2/NGAL,	16819	0,9413	0,762435	0,896487
LIX	20311	0,8281	0,12039	0,873183
M-CSF	12977	0,8143	0,094469	0,873183
MMP-2	17390	0,9052	0,455912	0,873183
MMP-3	17392	0,9167	0,309694	0,873183
MMP-9	17395	1,037	0,770828	0,896487
Myeloperoxidase	17523	0,9195	0,553261	0,873183
Osteopontin (OPN)	20750	0,9776	0,933977	0,960625
Osteoprotegerin/TNFRSF11B	18383	0,895	0,427917	0,873183
PD-ECGF/Thymidine phosphorylase	72962	0,9443	0,622523	0,873183
PDGF-BB	18591	0,7597	0,373803	0,873183
Pentraxin 2/SAP	20219	0,8262	0,491828	0,873183
Pentraxin 3/ TSG-14	19288	0,9375	0,687446	0,873183
Periostin/OSF-2	50706	1,155	0,281924	0,873183
Pref-1/DLK-1/FA1	13386	0,932	0,540113	0,873183
Proliferin	18811	0,8434	0,164828	0,873183
Proprotein Convertase 9/PCSK9	100102	0,8948	0,197219	0,873183
RAGE	11596	0,7833	0,038163	0,8557
RBP4	19662	1,043	0,593801	0,873183
Reg3G	19695	0,9307	0,68213	0,873183
Resistin	57264	0,9954	0,972326	0,990977
E-Selectin/CD62E	20339	1,156	0,534154	0,873183
P-Selectin/CD62P	20344	0,8888	0,374574	0,873183
Serpin E1/PAI-1	18787	0,8526	0,14563	0,873183
Serpin F1/PEDF	20317	0,8183	0,139817	0,873183
Thrombopoietin	21832	0,7877	0,03534	0,8557
TIM-1/KIM-1/HAVCR	171283	0,7228	0,02131	0,796349
TNF-alpha	21926	0,8383	0,088239	0,873183
VCAM-1/CD106	22329	1,081	0,230399	0,873183

Zytokine	Entrez Gene ID	fold change	p-Wert	q-Wert
VEGF	22339	0,8523	0,113195	0,873183
WISP-1/CCN4	22402	0,8564	0,43874	0,873183



Anhang 2: p21-Immunfluoreszenzfärbung in embryonalen und neonatalen Kontrollherzen
 Sowohl in embryonalen und neonatalen Kontrollherzen zeigte sich in der p21-Immunfluoreszenz-Färbung eine heterogene nukleäre p21-Anfärbung, die ohne spezielle Kofärbung keinem Zelltyp zuzuordnen war. $n=4$ pro Gruppe. IVS – interventrikuläres Septum, P – Perikard, VW – Ventrikelwand



Anhang 3: Immunfluoreszenzfärbung mit zwei p16-Antikörpern in embryonalen und neonatalen Kontrollherzen

Die Kontrollherzen zeigten qualitativ keinen Unterschied zur Färbung des gesunden Myokards in cHccs^{+/+}-Herzen (s. 3.4.3). **A** Bei Färbung mit dem Proteintech-Antikörper waren nur vereinzelt zytoplasmatisch p16-positive Zellen im embryonalen Myokard (Pfeilspitzen) auszumachen. **B** Im neonatalen Herzen färbte der Proteintech-Antikörper nur Zytoplasma an. **C+D** Im Gegensatz dazu im embryonalen wie auch im neonatalen Herzen ubiquitäre nukleäre Anfärbung mit schwachem zytoplasmatischen Signal bei Verwendung des p16-Antikörpers von Abcam. n=4 pro Gruppe. IVS – interventrikuläres Septum, LV – linker Ventrikel, LVW – linksventrikuläre Wand, P – Perikard.

Publikationsverzeichnis

Häde JP, Jux C, Drenckhahn JD. Mitochondrial dysfunction in embryonic and neonatal mouse cardiomyocytes suggests diverse roles of cyclin dependent kinase inhibitors in myocardial stress response. *Vortrag im Rahmen der DGPK Jahrestagung*, 1. März 2020, Wiesbaden, Deutschland

Ehrenwörtliche Erklärung

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

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Was lange währt, wird (hoffentlich) endlich gut. An dieser Stelle möchte mich bei allen bedanken, die mich auf dem langen Weg dieser Dissertation begleitet haben.

Als Erster muss hier Jörg Drenckhahn stehen. Danke für deine Bereitschaft, mich noch vor Umzug des Labors nach Gießen als Doktorand anzunehmen. Danke, dass man dich selbst mit Last-Minute-Stipendiums-Anträgen nicht aus der Fassung bringen konnte. Danke für alles, was ich an praktischer Laborarbeit von dir lernen durfte. Danke für jeden wertvollen inhaltlichen Input. Danke für einen langen Geduldsfaden bei meinem selbstkritischen Im-Kreis-Drehen und für intensive Korrekturarbeiten (intensiver als mir manchmal lieb war). Danke, dass ich ständig mit Fragen, ob ich stören darf, stören durfte. Vielen, vielen Dank für alles – nicht zuletzt auch für ein wirklich gutes Miteinander.

Herzlichen Dank natürlich auch an Prof. Christian Jux – nicht jeder Doktorand kann auf so schnelle Antworten und Korrekturen eines Chefarztes hoffen, wie ich sie erlebt habe. Danke für jede kritische Nachfrage und die Förderung, die ich erfahren durfte.

Zu den Lab-Heroes gehören natürlich noch mehr. Besonderer Dank gebührt hier unseren TAs, Ebru und Kirstin, die einen blutigen Laboranfänger wie mich mit Rat und Tat unterstützt haben. Und wahrscheinlich mehr als ihnen lieb war auch hinter mir herräumen mussten. Vielen Dank dafür! Danke auch an Paniz und Nina für euer Teilhaben und guten Austausch!

Großer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Fundament gelegt haben, auf dem ich stehen darf. Vielen Dank für eure Prägung, eure Unterstützung, euer Dasein, eure Investition in uns! Dankbar bin ich auch für meine Geschwister, die mich ebenso geprägt haben und immer für mich da sind. Insbesondere danke dir David, für alle Korrekturen und das Mutmachen. Wie schön, dass unser Leben so viele Schnittstellen aufweist. Dankbar bin ich auch meiner Schwiegerfamilie, unserer Gießener Familie, den Gießener Hasen und Freunden: Danke euch allen für jede Motivation, jede Korrektur und eure Freundschaft!

Zu guter Letzt gebührt mein Dank meiner eigenen kleinen Familie: Josephine, das Wort „Doktorarbeit“ hat schon früh zu deinem Wortschatz gehört – danke, dass du Papa auch mal am Schreibtisch hast sitzen lassen, danke aber auch für jede zuckersüße Unterbrechung. Du bist einfach unglaublich. Und Karo – danke für deine Unterstützung, für alles Rücken-Freihalten (selbst im Wochenbett), dein Mutmachen in schwierigen Zeiten und deine Liebe. Danke, dass du mein Leben bereicherst. Ich liebe euch!