

Justus-Liebig-Universität Gießen

Fachbereich Medizin

Klinik für Herz- Kinderherz- und Gefäßchirurgie

**Die Bedeutung von Biomarkern und der extrazellulären
Matrix in der Transition von kompensatorischer
Adaptation zur Herzinsuffizienz**

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach Herzchirurgie

im Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dr. med. Manfred Richter

Gießen 2017

Für Uta und Fee

Diese kumulative Habilitationsschrift basiert auf den folgenden Publikationen:

1. Animal Models and “Omics” Technologies for Identification of Novel Biomarkers and Drug Targets to Prevent Heart Failure

Hou Y*, Adrian-Segarra JM*, **Richter M***, Kubin N, Shin J, Werner I, Walther T, Schönburg M, Pöling J, Warnecke H, Braun T, Kostin S and Kubin T.

BioMed Research International, 2015 Article ID 212910

**Gleichberechtigter Erstautor*

2. Distinct structural and molecular features of the myocardial extracellular matrix remodeling in compensated and decompensated cardiac hypertrophy due to aortic stenosis

Polyakova V*, **Richter M***, Ganceva N, Lautze HJ, Kamata S, Pöling J, Beiras-Fernandez, Hein S, Szalay Z, Braun T, Walther T, Kostin S.

International Journal of Cardiology (Heart & Vessels) Vol 4, 145-160

**Gleichberechtigter Erstautor*

3. Oncostatin M Induces FGF23 Expression in Cardiomyocytes

Richter M, Polyakova V, Gajawada P, Pöling J, Warnecke H, Braun T, Walther T, Kubin T.

J Clin Exp Cardiol S9:003. doi: 10.4172/2155-9880.S9-003

4. The failing heart is a major source of circulating FGF23 via oncostatin M receptor activation

Richter M, Lautze HJ, Walther T, Schönburg M, Braun T, Kostin S and Kubin T.

Journal of Heart and Lung Transplantation 34(9), 1211-1214

5. The failing human heart is characterized by decreased numbers of telocytes as result of apoptosis and altered extracellular matrix composition

Richter M, Kostin S.

Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2015 DOI: 10.1111/jcmm.12664

6. Modulation of miRNAs in Aneurysms of the Ascending Aorta: Local versus Circulating Expression Levels

Manfred Richter, Ali El-Sayed Ahmed, Spiros Marinos, Andreas Zierer, Anton Moritz, Andres Beiras-Fernandez and Isabella Werner

Int J Cardiovasc Res doi:10.4172/2324-8602.1000248

Abkürzungen.....	5
1. Einleitung	6
1.1 Die Bedeutung eines besseren Verständnisses der kardialen Pathogenese	6
1.2 Die Bedeutung neuer kardiovaskulärer Biomarker	7
1.3 Die Analyse des Oncostatin M als Mittel zur Identifikation von neuen kardialen Biomarkern	9
1.4 FGF23 als Biomarker der Aktivität des Oncostatin M im remodellierenden Herzen	10
2. Ergebnisse und Diskussion	12
2.1 Die experimentelle Strategie zur Identifikation und Funktionsanalyse von sekretierten Biomarkern im remodellierenden Herzen	12
2.2 Die Remodellierung der extrazellulären Matrix bei Patienten mit kompensierter und dekompensierter Herzhypertrophie	17
2.3 Kardiomyozyten exprimieren und sezernieren FGF23	23
2.4 Die Freisetzung des FGF23 in die Zirkulation durch das insuffiziente Herz ist Oncostatin M abhängig	29
2.5 Die Komposition der extrazellulären Proteine beeinflusst die Zahl der Telozyten im menschlichen Myokardium	34
2.6 Zirkulierende und lokale microRNAs bei Patienten mit einem Aneurysma der Aorta ascendens	39
3 Zusammenfassung/Summary	41
4 Publikationen.....	46
5 Referenzen	50
6 Danksagung	60
7 Erklärung gem. § 5 Abs. 1 Nr. 11 HO.....	61

Abkürzungen

BMP-1:	Knochenmorphogenetisches Protein-1 (bone morphogenetic protein 1)
cFGF23:	C-terminales FGF23
DCM:	Dilatative Kardiomyopathie
ECM:	Extrazelluläre Matrix
EF:	Ejektionsfraktion
ELISA:	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FGF:	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (fibroblast growth factor)
FGF23:	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23
FGFR:	Fibroblasten-Wachstumsfaktor Rezeptor (fibroblast growth factor receptor)
gp130:	gp130, Korezeptor der Interleukin-6 Klasse der Zytokine
ICM:	Ischämische Kardiomyopathie
iFGF23:	intaktes FGF23
IGF-1:	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (insulin-like growth factor)
LIF:	Leukämiehemmender Faktor (leukemia inhibitory factor), Mitglied der Interleukin-6 Klasse
LIFR:	Leukämiehemmender Faktor Rezeptor, (leukemia inhibitory factor receptor)
MCP-1:	Monozyten chemotaktisches Protein 1
nFGF23:	N-terminales FGF23
OSM:	Oncostatin M, Mitglied der Interleukin-6 Klasse der Zytokine
OSMR:	Oncostatin M Rezeptor (oncostatin M receptor)
Stat3:	Transkriptionsfaktor und essentieller Bestandteil der OSMR Signalkette (Signal transducer and activator of transcription 3)
TGF- β :	Transformierender Wachstumsfaktor- β (transforming growth factor- β)
Tn:	Troponin
TNF- α :	Tumor Nekrose Faktor- α
TSP:	Thrombospondin
WB:	Western Blot

1. Einleitung

1.1 Die Bedeutung eines besseren Verständnisses der kardialen Pathogenese

Zur Aufrechterhaltung der Homöostase benötigt der Körper mit seinen Organen eine kontinuierliche Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff über die Blutbahn. Das Herz als „Motor des Kreislaufs“ leistet dies, indem es mit ca. 100.000 Kontraktionen pro Tag etwa 10.000 Liter Blut befördert. Bei physiologischen Dauerbelastungen wie dem Ausdauertraining oder der Schwangerschaft versucht das Herz, den „Status Quo“ durch Zunahme an ventrikulärer Muskelkraft zu erhalten. Die daraus resultierende physiologische Hypertrophie ist durch die Erhaltung der ventrikulären Architektur und des Differenzierungsstatus der Kardiomyozyten bei gleichzeitiger Massenzunahme gekennzeichnet [1-3]. Ist das Herz nicht in der Lage, physiologisch auf eine Belastungssteigerung oder eine Myokardschädigung zu reagieren, werden evolutionär konservierte Mechanismen wie das „fetale Genprogramm“ aktiviert. Diese konservierten Adaptationsstrategien des menschlichen Herzens, hervorgerufen durch z.B. koronare Herzkrankheit, Hypertonie, Kardiomyopathien, Infektionen (Myokarditis) oder Klappenerkrankungen, wirken sich sowohl auf die Proteinkomposition als auch auf die Proteinlokalisierung in den betroffenen Ventrikeln und Atrien aus. Zur Unterscheidung dieses komplexen pathologischen Umbaus des Herzens von der physiologischen Adaptation ist der Begriff Remodellierung eingeführt worden (im Englischen „cardiac remodeling“) [2].

Waren die „programmierten zellulären Überlebensprogramme“ ursprünglich adaptive Strategien des Herzens, um mechanischen, metabolischen und infektiösen Herausforderungen standzuhalten, so führt die chronische Aktivierung dieser Prozesse zu pathophysiologischen Veränderungen des Myokards, die zur Herzinsuffizienz und letztendlich zum Tod des Patienten führen können [4-7].

Zu den verbreitetsten Herzkrankheiten in den Industriestaaten gehören die koronare Herzkrankheit und ihre Folgen (Myokardinfarkt; ischämische Kardiomyopathie) sowie die Herzklappenerkrankungen (insbesondere der Aortenstenose). Mit zunehmendem Alter der Bevölkerung steigt das Risiko, daran zu erkranken. Wird die zugrundeliegende kardiale Erkrankung nicht rechtzeitig erkannt und behandelt, kann dies zur Fibrose, dem Untergang von Myokardgewebe und zusätzlich durch die Zunahme an funktionslosen Herzmuskelzellen sogar zur Herzinsuffizienz führen. Untergegangene Herzmuskelzellen können nicht durch Zellteilung der überlebenden Kardiomyozyten ersetzt werden, da diese „terminal differenziert“ sind. Die Morbidität der Herzinsuffizienten liegt bei ca. 0,5 bis 1% in der Bevölkerung und steigt auf ca. 3% bei den über 80-Jährigen an. Die 5-Jahressterblichkeit von Patienten mit symptomatischer Herzinsuffizienz beträgt

mehr als 50% und die 1-Jahresterblichkeit der fortgeschrittenen Herzinsuffizienz liegt bei ca. 20% [8, 9].

Bei der Herzinsuffizienz handelt es sich um eine hochkomplexe Erkrankung, bei der eine ausgeprägte Wechselwirkung zwischen kardialer Struktur und Herzfunktion besteht. Somit ist die Herzinsuffizienz nicht nur als simples Pumpversagen zu sehen sondern viel differenzierter zu betrachten. Das Ausmaß der kardialen Dysfunktion spiegelt sich in der Degeneration der Kardiomyozyten, der Fibrose und der Zellinfiltration wider. Die Komplexität der Entwicklung und des Fortschreitens der Herzinsuffizienz wurde bereits im Jahr 2000 auf einem internationalen Forum in einem „Konsensus Paper“ festgehalten. Sinngemäß heißt es dort: Obwohl die Bestimmung der Ejektionsfraktion (EF) zuverlässig die Behandlung der Herzinsuffizienz einleitet, so unterscheiden sich doch die Meinungen bezüglich der EF Daten in der weiterführenden Therapie [4]. Die Rolle der Echokardiographie oder anderer Bildgebungsverfahren im Management und Monitoring der Herzinsuffizienz ist genauso unklar. Weiterhin heißt es: „Kliniker sollten den Zusammenhang zwischen Remodellierung und Fortschreiten der Herzinsuffizienz verstehen“. Die gegenwärtigen Therapien zielen hauptsächlich auf eine Verbesserung der Herzleistung und des (koronaren) Blutflusses ab, aber nicht primär auf die Ultrastruktur des Herzens. Therapien sind daher oft nur symptomatisch. Nur mit einem besseren molekularen Verständnis der Pathogenese kann letztendlich die Remodellierung des Herzens reduziert und die Transition zur Herzinsuffizienz verzögert werden.

Grundlage meiner Forschungsarbeiten ist die Hypothese, dass die Entwicklung der chronischen Herzinsuffizienz mit der strukturellen Remodellierung des Herzens einhergeht und dass diese Veränderung sich in der Sekretion kardialer Moleküle widerspiegelt. Um neue Biomarker und idealerweise „Drug Targets“ zu identifizieren, wurden Analysen mit „state-of-the-art“ Techniken an Patientenproben des geschädigten menschlichen Herzens, an Oncostatin M behandelten Herzmuskelzellen in der Zellkultur und an verschiedenen Tiermodellen durchgeführt. Wir fokussieren uns im Wesentlichen auf Proteine als Biomarker und ich möchte im Folgenden deren Bedeutung erörtern.

1.2 Die Bedeutung neuer kardiovaskulärer Biomarker

Es ist allgemein anerkannt, dass trotz weltweiter intensiver Forschungs- und Entwicklungsarbeiten die Zahl und Spezifität von kardiovaskulären Biomarkern und die therapeutischen Targets noch erheblich ausgebaut werden können [10]. Gegenwärtig ist das B-Typ natriuretische Peptid (BNP) der einzige Biomarker im klinischen Gebrauch für die Diagnose und die Therapieüberwachung der Herzinsuffizienz [11]. BNP hat jedoch lediglich einen prognostischen Wert und es gibt keinen alternativen Biomarker im klinischen Einsatz. Leider wird BNP auch bei Lungenembolie oder erhöhter Druckbelastung des

Myokards von Kardiomyozyten freigesetzt und ist daher kein zuverlässiger Herzinsuffizienzmarker [11].

Weitere gebräuchliche Biomarker beziehen sich lediglich auf die Myokardischämie: Bei Gewebeschäden werden zelluläre Proteine von Herzmuskelzellen freigesetzt und können im Serum nachgewiesen werden.

Einer der frühesten zirkulierenden Marker ist das Myoglobin, welches bereits innerhalb von 2 Stunden nach einem Myokardschaden nachweisbar ist. Der Myoglobintest weist jedoch auch einige Schwachstellen auf: die geringe Halbwertszeit des Myoglobins, die geringe Sensitivität gegenwärtiger Assays und der Mangel an Spezifität, da Myoglobin auch vom Skelettmuskel nach einer Schädigung freigesetzt werden kann [11], wirken sich negativ auf die Zuverlässigkeit der Untersuchungsergebnisse aus.

Ein weiterer Biomarker ist die herzmuskelspezifische Kreatinkinase (CK-MB), die innerhalb von 2 Stunden nach einem Infarkt im Blut zirkuliert und bis zu 2 Tagen im Serum nachweisbar ist.

Jedoch sind die am meisten verwendeten Assays zum Nachweis eines Myokardinfarktes die Troponine, die auf Grund ihrer Spezifität und Sensitivität den CK-MB Nachweis als Goldstandard teilweise ersetzt haben. Von den drei Troponinen (Tn) werden TnT und TnI als Biomarker im klinischen Alltag eingesetzt, während das TnC geringe Kardiospezifität besitzt. Während TnT und TnI innerhalb von 2-3 Stunden nach dem Auftreten der Symptome nachweisbar sind, schränkt die lange Halbwertszeit dieser Proteine den Troponintest bei einem Wiedereintreten eines Infarktes in seiner Aussagekraft ein. Eine weitere Einschränkung liegt in der posttranslationalen Modifikation [11], die sich auf die exakte Quantifizierung auswirken kann. Obwohl Troponine gegenwärtig die besten Biomarker im klinischen Alltag des Myokardinfarktnachweises sind, können auch andere Krankheitsursachen wie die Niereninsuffizienz zur Freisetzung von Troponin beitragen [11, 12]. Es kann auch nicht absolut ausgeschlossen werden, dass der Skelettmuskel unter chronischen Belastungen wie z.B. bei einem Marathonlauf oder anderen Erkrankungen wie z.B. der Polymyositis kardiales Troponin freisetzt. Obwohl Troponin unzweifelhaft einer der besten Biomarker einer Herzschildigung ist, besteht großer Bedarf nach weiteren Markern, um mit einem umfassenderen Panel an Biomarkern zu einer genaueren Diagnose zu gelangen und bessere therapeutische Strategien für den einzelnen Patienten zu entwickeln. Eine Verbesserung des „Arsenals“ an Biomarkern würde zu einer dem Patienten angepassteren „personalisierten Medizin“ führen. Die vorliegende Arbeit verfolgt daher zum einen das Ziel, sekretierte Moleküle (Proteine, miRNAs) zu erforschen, die möglichst im direkten kausalen Zusammenhang mit der Entwicklung der Herzinsuffizienz stehen. Letztendlich können Biomarker auch ein therapeutisches Target darstellen. Die Arbeit hat weiterhin das langfristige Ziel, neue zirkulierende Biomar-

ker zu finden, die den Zustand des Patienten reflektieren und die dazu genutzt werden können, die Herzerkrankung und deren Fortschreiten zu erkennen und zu definieren. Sie könnten dann als prognostisches Mittel einen weiteren Baustein in der zuvor genannten personalisierten Medizin bilden.

1.3 Die Analyse des Oncostatin M als Mittel zur Identifikation von neuen kardialen Biomarkern

Die chronische strukturelle Remodellierung ist ein wesentlicher Bestandteil der Entwicklung der Herzinsuffizienz und spiegelt sich auch in der Sekretion kardialer Proteine wider. Die Idee, dass sekretierte Proteine eine wichtige Rolle bei der Herzinsuffizienz spielen, ist bereits in der Zytokin-Hypothese von Seta formuliert worden [13]. Gemäß dieser Hypothese tragen aktivierte Zytokinkaskaden zur Progression der Herzinsuffizienz nach einem Myokardschaden bei. Während Seta in seiner Veröffentlichung aus dem Jahre 1996 betont, dass inflammatorische Proteine per se nicht unbedingt Herzversagen hervorrufen, so zeigen doch gerade neuere Studien in verschiedenen Tiermodellen mit genmodifizierten Mäusen, dass die (De)Aktivierung einer einzigen Zytokinkaskade zur Herzinsuffizienz führen kann. Die herzspezifische Überexpression des Monozyten chemotaktischen Proteins-1 (MCP-1) und die chronische transgene Aktivierung der TNF Kaskade durch die Überexpression der I κ B kinase (IKK2) im Herzen führt zur inflammatorischen Herzinsuffizienz [14-16]. Interessanterweise kann es auch zur entzündlichen Herzinsuffizienz kommen, wenn ein anti-inflammatorisches Zytokin deletiert wird. Es ist von zwei unabhängigen Gruppen gezeigt worden, dass der knock-out des TGF- β 1 zwar nicht zu entwicklungsbiologischen Abnormitäten führt, aber eine massive Myokarditis und eine unkontrollierbare Entzündung in verschiedenen Organen hervorruft, an der die Mäuse innerhalb von drei Wochen nach der Geburt sterben [17, 18]. Des Weiteren kann der Verlust einer Signalkette unter pathologischen Bedingungen zur Herzinsuffizienz führen. So wurde im TAC Modell der Aortenstenose (transaortale Konstriktion, Verengung der Aorta mit einem Band) gezeigt, dass die kardiospezifische Deletion des gp130 Rezeptors zum Untergang von Herzmuskelzellen, zu einer dilatativen Kardiomyopathie und einer erhöhten Sterblichkeit der KO-Mäuse führt [19]. Da gp130 als Korezeptor der ganzen Klasse der Interleukin-6 Zytokine fungiert, ist eine detaillierte Analyse der lebensrettenden Signalkaskaden im Tiermodell erschwert. Darüber hinaus sind verschiedene Mitglieder dieser Interleukin Subklasse wie der Leukämiehemmende Faktor und das Cardiotrophin im Zusammenhang mit einer Herzprotektion und Herzinsuffizienz [20-23] gut beschrieben, so dass sich detailliertere pathologische Mechanismen aus der gp130 defizienten Maus nur schwer ableiten lassen. Eine Sonderstellung in der Interleukin-6 Familie stellt das Oncostatin M (OSM) dar. OSM aktiviert den OSM/gp130 Rezeptor Komplex, welcher von anderen Mitgliedern der gleichen Zytokin Familie nicht aktiviert werden kann [24-26]. OSM Rezeptor defiziente Mäuse

sind gesund und fruchtbar, zeigen aber unter Belastung eine hohe Sterblichkeit [27-29]. Es konnte gezeigt werden, dass der OSM Rezeptor ein Janusgesicht hat, weil er auf der einen Seite eine starke protektive Wirkung auf Kardiomyozyten nach einem akuten Myokardinfarkt ausübt, auf der anderen Seite aber bei chronischer Aktivierung die Progression der Herzinsuffizienz befördert [16, 27, 28, 30]. Die genauen Mechanismen dieser gegensätzlichen Wirkung sind noch zu klären, aber die Dedifferenzierung dürfte eine wesentliche Rolle spielen. Eine kurzzeitige Dedifferenzierung – wie nach einem akuten Infarkt - ermöglicht den Herzmuskelzellen sich auf den veränderten metabolischen und ischämischen Stress einzustellen, während eine chronische Dedifferenzierung zum Abbau von Sarkomeren und zur Degeneration der Herzmuskelzellen führt. Der OSMR/gp130 Komplex stellt daher ein vielversprechendes therapeutisches Target dar und trägt zur Entdeckung von neuen Biomarkern wie dem Fibroblasten-Wachstumsfaktors 23 (FGF23) [5, 31, 32] bei Herzerkrankungen bei. Leider konnten wir OSM nicht im Serum und in der Perikardflüssigkeit von herzkranken Patienten nachweisen. OSM ist daher als zirkulierender Biomarker ungeeignet (unveröffentlichte Resultate).

1.4 FGF23 als Biomarker der Aktivität des Oncostatin M im remodelierenden Herzen

Durch die hohen Konzentrationen des FGF23 in der Perikardflüssigkeit und seine massive Induzierbarkeit durch Oncostatin M in Herzmuskelzellen ist dieser Wachstumsfaktor in den Fokus meiner Studien gerückt [5, 31, 32]. Die experimentellen Ergebnisse und Veröffentlichungen werden im Abschnitt „Ergebnisse und Diskussion“ zusammengefasst. Es soll hier kurz ein Überblick zum FGF23 gegeben werden.

FGF-23 ist im Jahre 2000 entdeckt worden und damit das jüngste Mitglied der 22 FGFs umfassenden Fibroblasten-Wachstumsfaktor Familie [33]. FGFs sind hauptsächlich parakrin und autokrin wirkende Wachstumsfaktoren, die in der Embryogenese und Organogenese eine wichtige Rolle spielen [34]. Innerhalb der FGFs ist die FGF19 Subfamilie von besonderem Interesse, da sie als endokrine Faktoren verschiedene metabolische Prozesse im Erwachsenenalter regulieren [35]. Zu ihr gehören drei Mitglieder, das FGF15/19, das FGF21 und das FGF23, wobei FGF19 das humane Ortholog zum FGF15 der Maus ist. Daher besteht die FGF Familie aus insgesamt nur 22 Mitgliedern. Im Unterschied zu den anderen FGFs sind die Mitglieder der FGF19 Subfamilie hoch diffundierende Moleküle mit geringer Bindungsaffinität für die extrazelluläre Matrix (Heparin Sulfat) und werden daher als endokrine Faktoren betrachtet [35]. Auf der anderen Seite zeigen endokrine FGFs eine geringe Bindungsaffinität für ihre Rezeptoren auf den Zielzellen und benötigen daher α - und β -Klotho als Korezeptoren für die Aktivierung des entsprechenden FGF Rezeptors. Die primäre Quelle des FGF15/19 ist das Ileum, es wird

aber auch im Hirn, der Haut, der Retina und der Gallenblase detektiert. Es reguliert die Synthese von Gallensäuren und hat eine starke Wirkung auf den Glucose- und den Fettstoffwechsel. FGF21 ist reichlich im Pankreas, den Testes und der Leber vorhanden und reguliert die Aufnahme von Glukose in Adipozyten.

FGF23 wird hauptsächlich von Osteozyten als Antwort auf hohe zirkulierende Phosphatkonzentrationen produziert [36]. Geringe Expressionen wurden auch im Thymus, Milz, in Teilen des Gehirns und im Herzen nachgewiesen [33, 36]. FGF23 ist ein Phosphatonin und beeinflusst den Mineralstoffwechsel. Erhöhte Blutspiegel des FGF23 inhibieren die Sekretion des Parathormons (PTH) und reduzieren die Produktion von 1,25(OH)₂-Vitamin D. Eine erhöhte Konzentration des FGF23 hemmt weiterhin die Natrium-Phosphat-Kotransporter 2a und 2c in den proximalen Tubuluszellen der Niere, die für die Phosphatresorption verantwortlich sind, was zu einem Abfall des Phosphatspiegels im Blut führt [37]. Durch die Erkenntnis, dass ein hoher Serumphosphatspiegel bei Patienten mit Nierenerkrankungen einer der potenten Indikatoren für eine erhöhte Mortalität ist, rückte FGF23 immer mehr ins Zentrum der Erforschung chronischer Nierenerkrankungen. So wurde zum Beispiel festgestellt, dass Patienten, die zur Dialyse kommen, eine im Vergleich zu Nierengesunden bis zu 1000-fach höhere FGF23 Konzentration im Serum aufweisen können [38]. Trotz der Korrelation zwischen chronischer Nierenerkrankung und stark erhöhtem FGF23 ist es aber nicht klar, ob die Erhöhung dieses Phosphatonins eine direkte Toxizität auf Gewebe ausüben kann oder ob lediglich die Schädigung der Niere widerspiegelt [39].

Während ursprünglich das Anwachsen der Serumkonzentration von FGF23 bei Patienten mit chronischer Nierenkrankheit als Indikator einer Niereninsuffizienz gesehen wurde, besagen neuere Studien, dass erhöhte Konzentrationen des FGF23 in Abwesenheit eines Nierenschadens im Zusammenhang mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko und einer gesteigerten Mortalität zu sehen sind [40, 41]. Weiterhin sind erhöhte zirkulierende und lokale Konzentrationen des FGF23 im Myokard mit größerer ventrikulärer Masse, einem Myokardinfarkt, einer Myokarditis und einer Herzinsuffizienz assoziiert [5, 31, 32, 42-46]. Die genaue Funktion des FGF23 in der Pathogenese kardialer Erkrankungen ist noch unklar, aber eine kürzlich erschienene Publikation beschreibt eine direkte klotho unabhängige hypertrophe Wirkung des FGF23, welche durch den FGFR4 in Herzmuskelzellen vermittelt wird [43, 47]. Unser Ziel ist es nun, die Wirkung und Regulation des FGF-23 im Herzen zu verstehen. Die in der Zellkultur und im Tiermodell gefundenen Ergebnisse sollen mit Patientenproben verglichen werden, um Parameter zu finden, die prognostische Auskunft über den Erfolg einer Therapie beziehungsweise einer Transplantation geben können.

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1 Die experimentelle Strategie zur Identifikation und Funktionsanalyse von sekretierten Biomarkern im remodellierenden Herzen

Eine unserer Strategien, um neue Biomarker mittels Zellkultur zu finden, basiert auf der Annahme, dass durch Oncostatin M behandelte primäre Herzmuskelzellen die Komplexität von Screens auf ein Minimum reduziert wird. Diese Vorgehensweise stellt somit eine vereinfachte, aber effiziente Methode der Biomarkersuche dar. Dies möchte ich hier kurz erörtern. Adulte Herzmuskelzellen können in hoher Qualität isoliert werden und bringen ihren genetischen, epigenetischen und ihren Proteom-Status in die Kultur ein. Im Gegensatz zu Zelllinien, die viele *in vivo* Merkmale durch kontinuierliches Passagieren verlieren, kann man mit frisch isolierten Kardiomyozyten viele Aspekte der Pathogenese unterschiedlicher Herzerkrankungen detailliert analysieren [5, 27, 48, 49]. Weiterhin kann die Funktion vieler Gene selektiv durch siRNA knock-down vorab eingeschätzt oder sogar geklärt werden. Im Tierversuch kann dies durch den enormen Zeitaufwand bei der Züchtung entsprechender knock-out Mäuse in einem Screen nicht realisiert werden. In der Zellkultur identifizierte vielversprechende Kandidaten können dann aber in genmodifizierten Mäusen und in menschlichen Proben weiter analysiert werden.

Diesen Ansatz haben wir verfolgt, indem wir eine Sekretomanalyse von Oncostatin M stimulierten primären adulten Herzmuskelzellkulturen durchgeführt haben. Oncostatin M ist eines der stärksten Zytokine, das sowohl die Remodellierung von Kardiomyozyten anregt als auch durch die Induktion der Sekretion von Proteinen die Regeneration des geschädigten Herzens orchestriert [5, 28]. Unter dem Sekretom versteht man die Gesamtheit aller sekretierten Peptide und Proteine. Mit einer Zahl von 3000-4000 machen diese mehr als 10% des gesamten exprimierten Genoms aus [50]. OSM hat nicht nur eine starke dedifferenzierende Wirkung auf Herzmuskelzellen [27], sondern reguliert durch die Freisetzung von Chemokinen - wie zum Beispiel der regenerierenden Proteinfamilie (Reg1; Reg3 α , 3 β , 3 γ) [28] - auch die Infiltration in das geschädigte Myokard. Weiterhin hat OSM durch die starke Sekretion von TIMP1 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1) und verschiedenen MMPs (matrix metalloproteinasen) auch Einfluss auf die Remodellierung der extrazellulären Matrix [28]. Zu den bereits bekannten kardialen Biomarkern, die sich als Oncostatin M Targets herausstellten, gehören das Interleukin-6, das ANP und das BNP [5, 27]. Eine weitere Strategie zur Validierung der in der Zellkultur gefundenen potentiellen Biomarker ist die Analyse der Perikardflüssigkeit, des Serums und des Myokardgewebes von Patienten mit verschiedenen Herzerkrankungen. Die Untersuchungen an humanen Proben werden durch Ergebnisse an einem Mausmodell der inflammatorischen Herzinsuffizienz ergänzt auf das ich unter Punkt 2.3 und 2.4 noch genauer eingehen werde. Im Folgenden möchte ich ei-

nen Überblick über die Techniken geben, mit denen wir kultivierte Herzmuskelzellen, Zellkulturüberstände, Serum und Perikardflüssigkeit analysiert haben.

Zu den technisch im Labor am einfachsten durchzuführenden Methoden gehören der auf Antikörper basierende ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) und die Multiplex Systeme. Das zu untersuchende Protein wird durch den Erstantikörper auf eine Mikrotiterplatte fixiert und mit einem Enzym- (ELISA) oder Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Zweitantikörper (ELISA, Multiplex), der an das gleiche Protein bindet, sichtbar gemacht. Gemessen und quantifiziert wird danach der Farbumschlag, die Chemilumineszenz oder die Fluoreszenz. Während man mit dem ELISA normalerweise ein Protein pro Probe bestimmt, kann man mit den bisher erwerblichen Multiplex-Systemen mehr als 30 Antigene detektieren. Die Vorteile dieser Nachweismethoden gegenüber anderen proteinanalytischen Techniken liegen in der Geschwindigkeit (die Messergebnisse erhält man am gleichen Tag), Genauigkeit und Sensitivität (wenige pg/ml Flüssigkeit können detektiert werden), was sie zu idealen Methoden für die Bestimmung von sekretierten Proteinen in Flüssigkeiten macht. Für viele der zu bestimmenden Proteine sind Assays käuflich erwerblich, so dass man mit den Messungen direkt beginnen kann, ohne Zeit für die Entwicklung einer Nachweismethode zu verlieren.

Während ELISA und Multiplexsysteme für Flüssigkeiten ideal sind, können diese Nachweisverfahren für Gewebe oder Zellen nur begrenzt eingesetzt werden, da die zu bestimmenden Antigene aus dem Analyt mit einem oft für den ELISA/Multiplex unverträglichen Puffer herausgelöst werden müssen oder aber das Gewebe mit einem Assaykompatiblen Puffer nur unvollständig lysiert wird. Dieses Problem kann mit dem Western Blot umgangen werden. Gewebe oder Zellen werden in einem starken Puffer mittels Ultraschall aufgeschlossen und die herausgelösten Proteine werden auf einem Gel getrennt, so dass der Lysepuffer nicht mehr mit dem weiteren Assay interferiert. Die separierten Proteine werden dann auf eine Membran transferiert (Blot) und anschließend mit Antikörpern hybridisiert. Wie beim ELISA bzw. Multiplexsystem wird das Antigen mittels Chemilumineszenz oder Fluoreszenz nach Hybridisierung mit einem markierten Zweitantikörper, der den Erstantikörper erkennt, in einem Scanner (z.B. Chemidoc, Odyssey) sichtbar gemacht. Die Western Blot Technologie gehört mit zu den am meisten verwendeten Labortechniken und gewinnt durch die immer größer werdende Zahl an käuflichen Antikörpern an Bedeutung. Die zunehmende Sensitivität (Detektionen im niedrigen Femtogramm Bereich sind inzwischen möglich) und die steigende Qualität der Antikörper (es gibt inzwischen exzellente monoklonale Antikörper aus dem Kaninchen) macht diese Technologie zu einem Schwerpunkt in jedem Labor. Der Western Blot liefert nicht nur Informationen über die Größe der Proteine sondern auch über mögliche posttranslationale Modifikationen (z.B. Phosphorylierungen, die mit speziellen Antikörpern am gleichen Protein bestimmt werden können. Weiterhin lassen sich dann die glei-

chen Antikörper in der Immunfluoreszenz einsetzen und wertvolle zusätzliche Informationen über Expressionsmuster und Lokalisation der zu analysierenden Substanz können im Myokardgewebe gewonnen werden. Trotz der Bedeutung der auf Antikörper basierenden Techniken liegt die Limitation in der Identifikation unbekannter Targets, da diese ja vorher definiert werden müssen. Die Identifikation unbekannter „Targets“ kann mit massenspektrometrischen Methoden umgangen werden. Für MALDI-TOF (**M**atrix-**A**ssistierte **L**aser-**D**esorption-**I**onisierung mit Flugzeitanalyse (**t**ime **o**f **f**light)) Analysen werden komplexe Proteingemische vorher mittels zwei-dimensionaler Gelelektrophorese (2-DE) aufgetrennt. In der ersten Dimension separiert die isoelektrische Fokussierung Proteine nach ihrer Ladung und in der zweiten werden Proteine nach Größe getrennt. Abhängig von der Komplexität der Probe können tausende von Proteinspots mittels Silberfärbung in einem Gel sichtbar gemacht werden. Anschließend werden die Gele gescannt und mit einer Software (Proteomweaver) verglichen und ausgewertet. Dieses führt zur Detektion differentiell regulierter Proteinspots, die dann aus dem Gel ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und im Massenspektrometer analysiert werden. Falls es sich um Proteine in sehr geringer Konzentration handelt, können diese mit der HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie), für die Analyse angereichert werden. Der Vorteil der 2-DE basierenden Massenspektrometrie liegt in der Möglichkeit, hochkomplexe Proteinmischungen im Gel aufzutrennen, zu vergleichen und unbekannte regulierte Proteine zu identifizieren. Im Gegensatz dazu muss man bei den Antikörper basierenden Methoden das Target definieren und ein spezifischer Antikörper muss erhältlich sein. Komplementär zu den Proteom-Screens sind die Transkriptom-Analysen. „High-Tech“ DNA/RNA Technologien ermöglichen die gleichzeitige Analyse der Expression von über 30000 Gensequenzen in Herzmuskelzellen. Eine vergleichende Datenanalyse dieser beiden „Omics“-Technologien hilft, vielversprechende Kandidaten zu selektieren und Targets zu identifizieren, die bei Anwendung nur einer der beiden Strategien durch den Filter „gerutscht“ wären. So fanden wir mittels Affymetrix GeneChip® Microarray-Technology FGF23 als eines der am stärksten exprimierten Gene nach Oncostatin M Stimulation, welches wir nicht über die Massenspektrometrie identifizieren konnten [5, 31, 32]. Ein weiterer Vorteil einer umfangreichen Zellkulturanalyse liegt in der Möglichkeit, sekretierte Proteine mit dem Differenzierungsstadium der Kardiomyozyten in Kultur zu korrelieren. So fanden wir heraus, dass Herzmuskelzellen einen „point of no return“ nach Oncostatin M Stimulation erreichen können, bei dem sie nicht mehr auf hypertrophe Stimulantien reagieren und nicht mehr redifferenzieren können [3, 5, 16, 30, 32]. Wichtig wäre jetzt, diesen „point of no return“ intrazellulär durch Strukturproteine und extrazellulär durch sekretierte Proteine beim Patienten abzugleichen, so dass wir aus den zirkulierenden Proteinen dann Rückschlüsse auf den Differenzierungsstatus des Myokards gewinnen können. Damit könnte man die Transition von kompensierter zu dekompensierter Herzhypertrophie, z. B. bei einer vorliegenden Aortenstenose besser

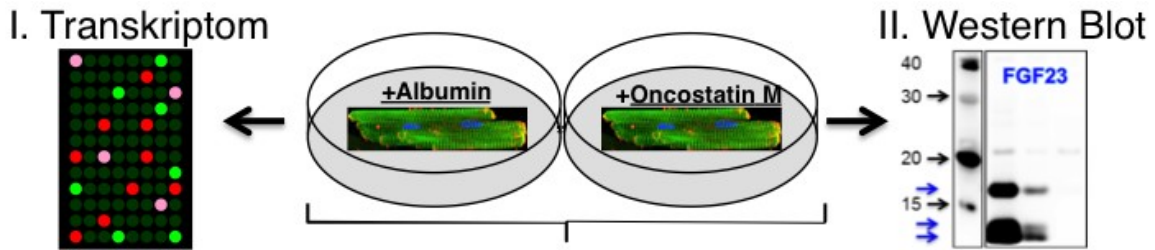
definieren, den Krankheitszustand des Patienten genauer bestimmen und langfristig die „personalisierte Medizin“ effizienter machen. Anhand neuer Biomarker könnte man dann idealerweise den Zeitpunkt bestimmen, an dem mit einer medikamentösen oder operativen Behandlung des Patienten das Reverse Remodeling eingeleitet werden sollte. Eine optimale Terminierung des Operationszeitpunktes bei Patienten mit asymptomatischer Aortenklappenstenose wäre somit möglich. Gerade in dieser Patientengruppe gestaltet es sich häufig kompliziert, den besten Operationszeitpunkt zu finden und den oftmals asymptomatischen Patienten die Notwendigkeit einer Operation zu vermitteln. In [Abbildung 1](#) wird ein Überblick über Strategie Biomarker zu identifizieren, gegeben.

Animal Models and “Omics” Technologies for Identification of Novel Biomarkers and Drug Targets to Prevent Heart Failure

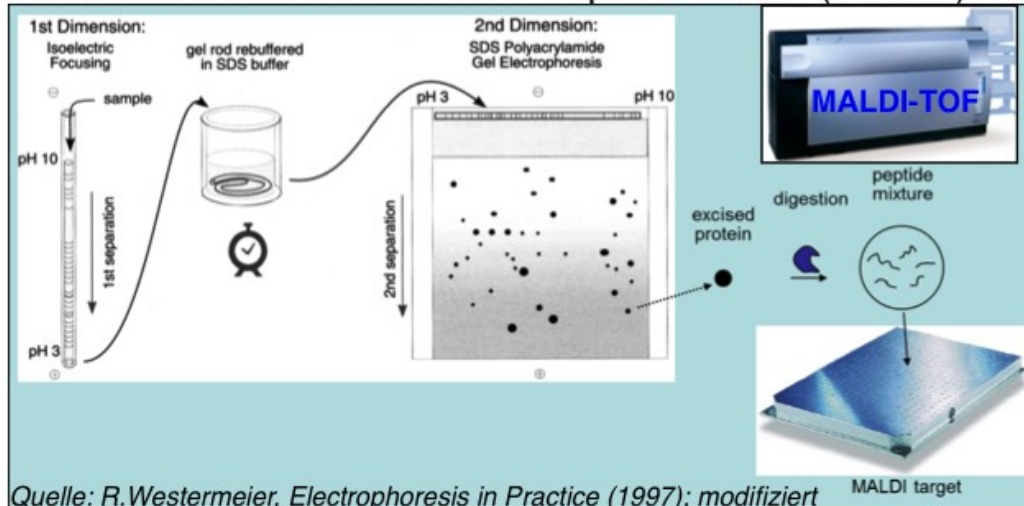
Hou Y*, Adrian-Segarra JM*, Richter M*, Kubin N, Shin J, Werner I, Walther T, Schönburg M, Pöling J, Warnecke H, Braun T, Kostin S and Kubin T.

BioMed Research International, 2015 Article ID 212910

**Gleichberechtigter Erstautor*

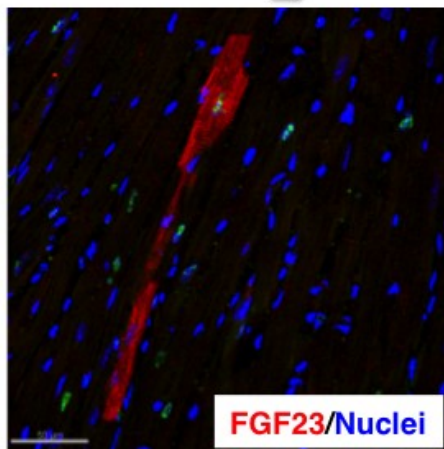


III. Proteom: 2DE & Massenspektrometrie (Protein)

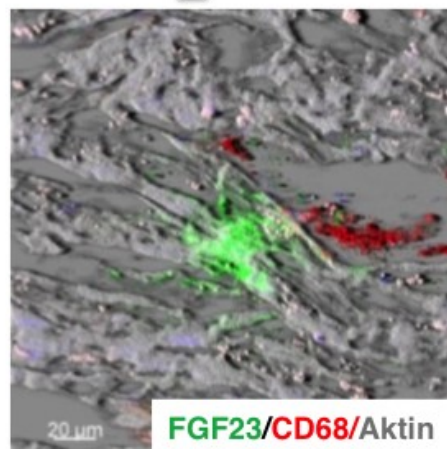


Identifikation von krankheitsrelevanten Proteinen

In Vivo Bestätigung



Inflammatorische
Herzinsuffizienz (Maus)



Patient mit milder
Aortenstenose

Abbildung 1: Experimentelles Schema zur Identifikation und Validierung von neuen Biomarkern am Beispiel des FGF23. Adulte Herzmuskelzellen werden für 7 Tage mit OSM stimuliert. Proteine im Überstand werden nach 2DE Trennung mit der MALDI-TOF Massenspektrometrie (III.) analysiert und die RNA des Zellysates (I.) für die Transkriptom Analyse verwendet. Die Expression des FGF23 in Kardiomyozyten wird mittels Western Blot (II.) verifiziert. Analysen mit der konfokalen Mikroskopie bestätigen die Regulation des FGF23 im Tiermodell der Herzinsuffizienz und im Patienten. ELISA Messungen des FGF23 in der Perikardflüssigkeit und im Serum ergaben dann erhöhte Werte für FGF23 bei Patienten mit Aortenstenose und präservierter Ejektionsfraktion (Daten nicht gezeigt).

2.2 Die Remodellierung der extrazellulären Matrix bei Patienten mit kompensierter und dekompenzierter Herzhypertrophie

Eine der verbreitetsten Herzkrankheiten in den Industriestaaten ist die Schädigung der Aortenklappe (Aortenstenose), die, wenn nicht chirurgisch therapiert, zur Herzinsuffizienz und Tod führen kann [51]. Der Prozess des ventrikulären Umbaus ist nicht nur durch die Remodellierung von Kardiomyozyten gekennzeichnet, sondern auch durch den Umbau der extrazellulären Matrix. Der Prozess der Herzmuskelzelldegeneration im Übergang von kompensatorischer zu dekompenzierter Hypertrophie ist bereits an anderer Stelle beschrieben worden [52, 53]. Die damit einhergehende Fibrose kann bei einer zu spät erfolgten chirurgischen Therapie nicht mehr zu beheben sein [54]. Es ist daher wichtig, die Bestandteile der ECM und das Ausmaß der Fibrose bei Patienten mit unterschiedlichem Grad der Aortenstenose zu determinieren. Ein wesentlicher Bestandteil der adulten extrazellulären Matrix (ECM) sind die fibrillären Kollagene Typ I und III, die als frisch synthetisierte N- und C-terminale Propeptide (Col I = PINP, Col III = PIIINP) von kardialen Zellen sezerniert werden. Die Entfernung der C-Termini von fibrillären Prokollagenen ist ein wesentlicher Schritt in der Vernetzung von Kollagenfasern wobei der Umbau von Kollagenen in der extrazellulären Matrix im Wesentlichen von Matrix Metalloproteinasen (MMP) und deren Inhibitoren (TIMP) reguliert wird [55]. Einer der wesentlichen Metalloproteinasen, die die C-Termini der Prokollagene-I und III schneidet, ist das Knochenmorphogenetische Protein-1 (BMP-1), das nicht wie die anderen BMPs (bone morphogenetic protein) zu der TGF- β Superfamilie gehört [56]. Neben dem fibrillären Collagen V spielen auch nicht-fibrilläre Kollagene wie Typ IV und VI eine noch wenig verstandene Rolle beim Umbau der extrazellulären Matrix. Weitere wichtige Proteine in der ECM sind die matrizellulären Proteine, wie die Thrombospondine, CTGF (connective tissue growth factor) und das Tenascin, die als nicht-strukturelle Proteine Einfluss auf den Aufbau von Kollagenfibrillen haben und Aktivitäten von verschiedenen Wachstumsfaktoren und Rezeptoren beeinflussen [57]. Unter den Fibrose regulierenden Zytokinen sind die TGF- β Familie und das TNF- α hervorzuheben, von denen bisher TGF- β 1 in der Pathogenese von Herzerkrankungen am intensivsten untersucht worden ist [58-61]. Um die molekularen Komponenten, die in dem Umbau der extrazellulären Matrix involviert sind, analysieren zu können, wurden subvalvuläre Septumresektionen von drei Gruppen von Patienten mit Aortenstenose mit unterschiedlicher Pumpleistung untersucht. 9 Patienten mit einer Ejektionsfraktion größer 50% stellten die Gruppe 1 (AS-1). 12 Patienten in Gruppe 2 hatten eine Ejektionsfraktion (EF) zwischen 30-50% (AS-2) und bei 9 Personen in Gruppe 3 war sie kleiner als 30% (AS-3). Da der fibrilläre Kollagenumsatz, die nicht-fibrillären Kollagene, die matrizellulären Proteine und die profibrotischen Zytokine zu analysieren waren, wurden alle Untersuchungen mit den auf Antikörper basierenden Techniken des Western-Blots und der konfokalen Mikroskopie durchgeführt. Alle Ergebnisse sind in [Tabelle 1](#) zusammengefasst.

Die fibrillären Kollagene Typ I und III im Übergang von kompensierter zu dekompensierter Herzhypertrophie infolge einer Aortenstenose

Messungen von Kollagen-I und III Vorläufern (PINP & PIIINP) und des Kollagen-I Degradationsproduktes (ICTP) beziehungsweise des vernetzten maturen Kollagen-III (IIINTP) ergaben eine stark erhöhte Synthese bei gleichzeitig verringertem Abbau des Kollagen-I was zu einer massiven Deposition dieses Kollagens im Myokard der Patientengruppe 3 führte ([Tabelle 1](#)). Die typische Lokalisation, Verteilung und Menge an Kollagen I und III im menschlichen Herzen sind in [Abbildung 2](#) dargestellt. Ein Vergleich der Kontrollherzen und der verschiedenen Patientengruppen mittels quantitativer Immunfluoreszenz ergaben die höchsten Kollagen III Ablagerungen in der Gruppe mit dekompensierter Hypertrophie (AS-3). Das Verhältnis von Kollagen III zu Kollagen I war 3.35 ± 0.48 im Kontrollgewebe und 3.1 ± 0.63 in der Gruppe mit kompensatorischer Hypertrophie (AS-1). Dieses Verhältnis verschob sich aber dramatisch in der Transitionsphase (AS-2) und erreichte einen Wert von 1.69 ± 0.46 bei Patienten mit dekompensierter Hypertrophie. Solch eine kumulative Verschiebung zum Kollagen I ist ein typisches Merkmal der dekompensierten Hypertrophie im Druck-überlasteten Herzen. Die erhöhte fibrotische Kollagen I- Akkumulation in der Gruppe 3 als typisches Merkmal einer Herzinsuffizienz wird durch die Erhöhung des Kollagen V, das an der Bildung von Kollagen-I Fibrillen beteiligt ist, möglich. Funktionell führt die erhöhte Ablagerung des Kollagen I zu myokardialer Steifheit (diastolische Dysfunktion) und Verschlechterung der Pumpleistung. Auch erhöhte Ablagerungen der nicht-fibrillären Kollagene IV und VI, die die Hauptkomponente der Basalmembran darstellen, konnten im Myokard bei Patienten mit dekompensierter myokardialer Hypertrophie nachgewiesen werden.

Matrizelluläre Proteine im Übergang von kompensierter zu dekompensierter Hypertrophie infolge einer Aortenstenose

Zu den im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysierten matrizellulären Proteine gehören die Tenascine, die Thrombospondine 1,2 und 4, das Osteopontin, das Osteonectin und das CTGF. Die Tenascine waren in der Kontrollgruppe gering exprimiert, stiegen aber mit zunehmenden Grad der Herzinsuffizienz stark an. Die Familie der Thrombospondine (TSPs) besteht aus 5 Mitgliedern, von denen das TSP1 und 2 die am besten untersuchten sind. TSP1 wird im Druck-überlasteten Herzen [\[62\]](#) induziert und ist ein Aktivator des TGF β 1. Außerdem moduliert es die Expression von MMPs und die Kollagensynthese [\[63\]](#). Das TSP1 ist kaum nachweisbar in den Herzen mit normaler Ejektionsfraktion, aber die Expression steigt in Patienten mit fortschreitendem Grad der Herzinsuffizienz an, während die Expression des TSP2 in den Patientengruppen 2 und 3 vergleichbar ist. TSP4 ist in der Gruppe drei stark exprimiert und scheint an der Regula-

tion der Fibrose im drucküberlasteten Herzen beteiligt zu sein [64]. Interessanterweise nimmt die Expression des TSP4 bei der Transition von der kompensatorischen in die dekompenzierte Hypertrophie massiv zu. Dies könnte als Reaktion des Myokards interpretiert werden, die zunehmende Fibrose des Herzens „in Schach zu halten“. Osteopontin war in allen Patientengruppen nur leicht erhöht und CTGF war in AS-3 deutlich erhöht. Bei der Expression des Osteonectins konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden. Dies deutet darauf hin, dass diese matrizellulären Proteine nur eine untergeordnete Rolle in der Entwicklung der Herzinsuffizienz spielen.

Profibrotische Zytokine im Übergang von kompensierter zu dekompenzierter Hypertrophie infolge einer Aortenstenose

Zu den bekanntesten regulierten Zytokinen im geschädigten Herzen gehören sowohl die TGF- β Familie - bestehend aus TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 - als auch der TNF- α . TGF- β wird von fast allen Zellen im Körper produziert und wird als inaktiver latenter Komplex sezerniert, der erst durch Proteaseaktivität als wirksames 25kDa Dimer freigesetzt wird. Die Bioverfügbarkeit des TGF- β ist weiterhin beschränkt, da es durch Komponenten der extrazellulären Matrix rasch beseitigt wird [65, 66]. Die Beteiligung der TGF- β Familie an der Herzregeneration und der Herzinsuffizienz ist umfassend beschrieben, obwohl sich die Mehrzahl der Veröffentlichungen auf das TGF- β 1 fokussieren [58, 67-69]. TGF- β 1 ist ein sehr starker profibrotischer Faktor der eine Myofibroblasten-Transdifferenzierung und die Expression von ECM Proteinen induziert [68]. Im Gegensatz dazu sollen TGF- β 2 und TGF- β 3 antifibrotisch wirken [70] und TGF- β 3 soll eine modulierende Wirkung auf die Narbenbildung ausüben [71]. In unserer Studie konnten wir zeigen, dass TGF- β 1 leicht ansteigt während TGF- β 3 im dekompenzierten Stadium erniedrigt vorliegt. Die profibrotische Wirkung des TGF- β 1 und der Verlust der anti-fibrotischen Wirkung des TGF- β 3 - als Gegengewicht einer überschießenden Fibroseentwicklung - würde zum klinischen Erscheinungsbild der Herzinsuffizienz in der Patientengruppe 3 passen. Die erhöhten Mengen an Smad2 und die verringerte Menge am Inhibitor Smad7 deuten auf eine gesteigerte Aktivierung des TGF- β 1 Signalweges hin. Weiterhin ist TGF- β 1 ein Schlüsselzytokin, das Makrophagen deaktiviert und die Produktion von inflammatorischen Mediatoren hemmt [68]. Hinweise auf die starke anti-inflammatorische Wirkung des TGF- β 1 geben knock-out Mäuse, die innerhalb von drei Wochen nach der Geburt an einer unkontrollierten Inflammation und Myokarditis versterben [17, 18]. Ob eine Aktivierung der Smad2/3 Signalkette auch zu der starken Reduktion von TNF- α Molekülen in den Patientengruppen 2 und 3 beiträgt, muss noch geklärt werden. Ein weiterer stark im geschädigten Herzen exprimiertes und sezerniertes Protein ist das FGF23, auf das ich in den Kapiteln 2.3 und 2.4 eingehen möchte.

Analysierte Proteine	Kompensierte Hypertrophie AS-1 EF > 50%	Übergangsphase AS-2 50% ≥ EF ≥ 30%	Dekompensierte Hypertrophie AS-3 EF < 30%
Kollagen I	+	++	+++
Kollagen III	++	++	+++
Kollagen III/Kollagen I ratio	++	-	--
Kollagen V	n	n	+
Kollagen IV	n	n	+
Kollagen VI	n	+	++
PINP	n	++	+++
ICTP	++	+	n
PIIINP	++	+	n
IIINT	n	++	+++
BMP1	+++	+++	+++
RECK	n	n	-
Osteonectin	n	n	n
Osteopontin	+	+	+
Tenascin	+	++	+++
Tenascin C	+	++	+++
TSP1	n	+	+++
TSP2	n	+++	+++
TSP4	n	n	+++
CTGF	n	n	++
TGF-β1	n	n	+
TGF-β2	n	n	n
TGF-β3	n	n	-
TAK1	n	n	--
Smad 1	n	+	++
Smad 2	n	+	++
Smad 3	+	++	+++
Smad 7	n	n	-
TNFα	n	--	--
TNFα-R1	+	++	++
TNFα-R2	n	n	++

Tabelle 1: Zusammenfassung der Resultate der Western Blots und der konfokalen Mikroskopie. Die Veränderungen sind angegeben im Verhältnis zu den Kontrollwerten. Die folgenden Abkürzungen bedeuten: n = unverändert; + = leicht erhöht; ++ = moderat erhöht, +++ = stark erhöht; - = leicht verringert; -- = moderat verringert. Diese Tabelle ist übernommen und modifiziert worden von unserer Publikation [54].

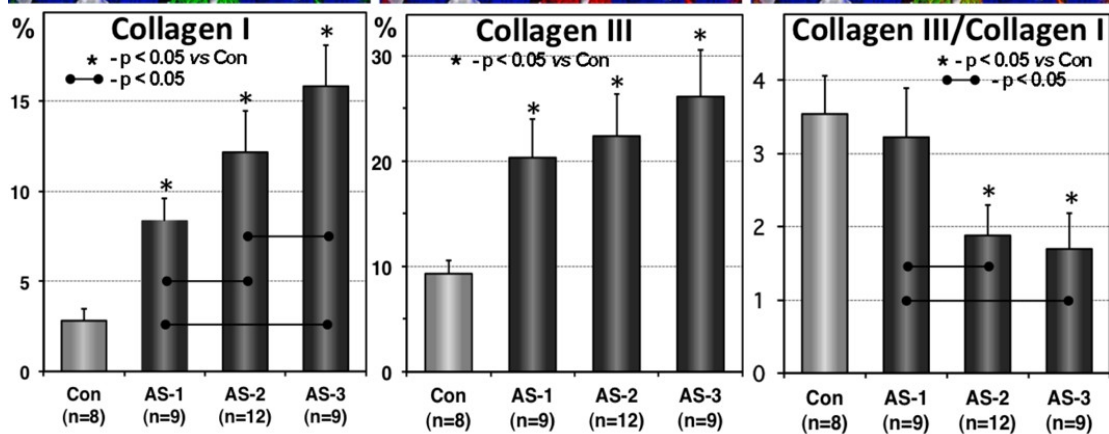
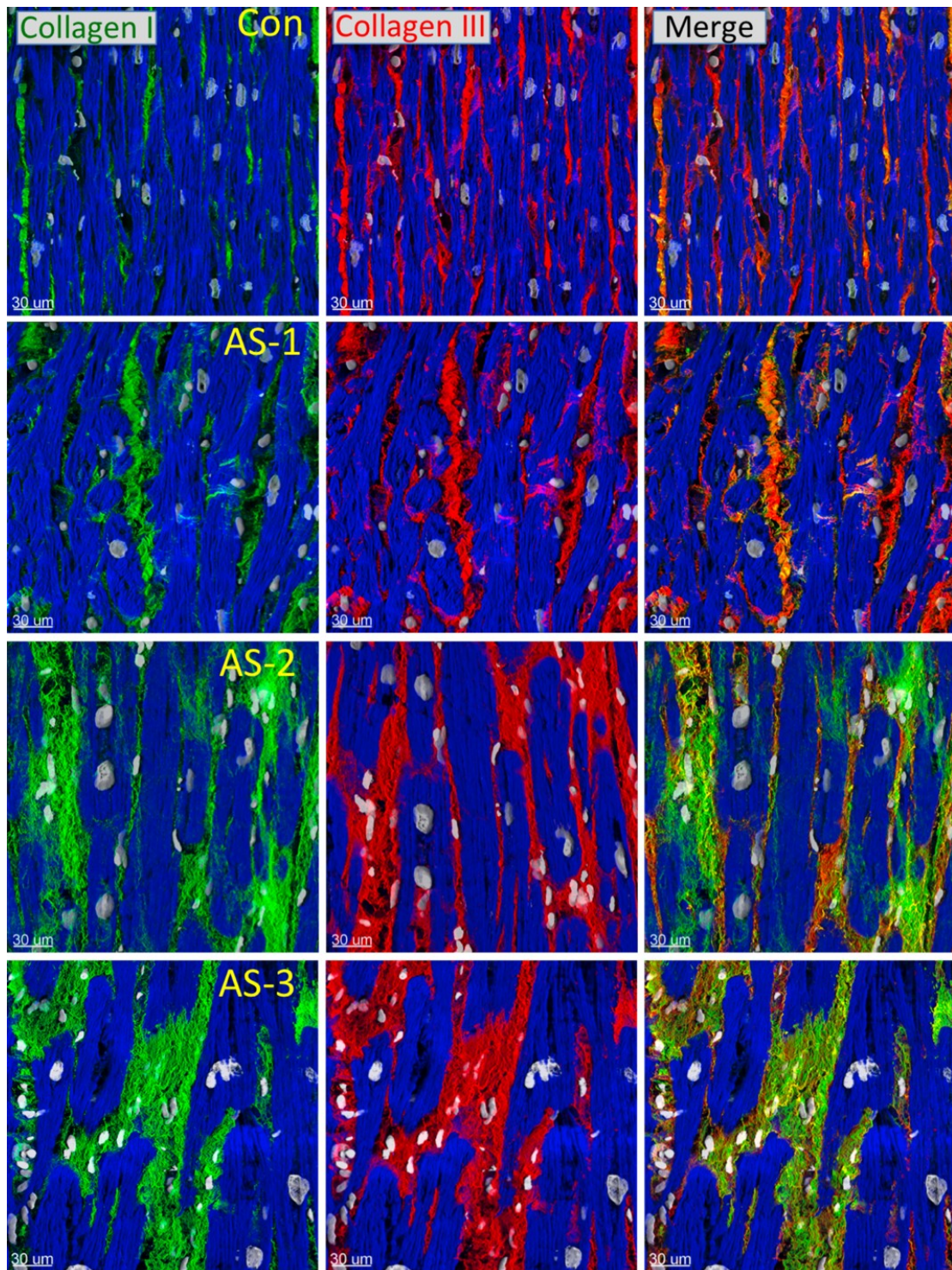


Abbildung 2: Konfokale Bilder der Laser-Mikroskopie vom Kollagen I (grün) und III (rot) in Kontrollen (Con) und Patienten mit Aortenstenose (AS) zeigen deutlich eine kontinuierliche Akkumulation fibrillärer Kollagene ausgehend von den Kontrollen (EF>60%) über AS-1 (EF>50%), AS-2 (EF=50-30%) bis hin zur Gruppe AS-3 (EF<30%). Die übereinandergelegten Bilder (Merge) zeigen deutlich die Prävalenz des Kollagen III über das des Kollagen I in der Kontrolle als auch in der AS-1 Gruppe. In den Gruppen AS-2 und AS-3 gleichen sich die relativen Mengen an beiden Kollagenen an. Kerne sind weiß und F-Aktin blau. Die unteren Diagramme geben die statistischen Auswertungen für Kollagene und das Verhältnis von Kollagen III zu I wieder. Man beachte, dass das Verhältnis von Kollagen III zu I deutlich niedriger in den Patientengruppen AS-2 und AS-3 als in AS-1 und den Kontrollen ist. Diese Abbildung ist übernommen worden von unserer Publikation [54].

Distinct structural and molecular features of the myocardial extracellular matrix remodeling in compensated and decompensated cardiac hypertrophy due to aortic stenosis.

Polyakova V*, Richter M*, Ganceva N, Lautze HJ, Kamata S, Pöling J, Beiras-Fernandez, Hein S, Szalay Z, Braun T, Walther T, Kostin S.

International Journal of Cardiology (Heart & Vessels) Vol 4, 145-160

**Gleichberechtigter Erstautor*

2.3 Kardiomyozyten exprimieren und sezernieren FGF23

Herzmuskelzellen sekretieren FGF23 nach Oncostatin M Stimulation

Es ist bekannt, dass Herzmuskelzellen eine ganze Reihe von Wachstumsfaktoren und Zytokinen exprimieren und sekretieren können [28, 72, 73]. Um herauszufinden, welche Faktoren hauptsächlich von Herzmuskelzellen unter Stressbedingungen produziert werden, wurden neben der Proteomanalyse auch eine Transkriptomanalyse von Oncostatin M stimulierten adulten Herzmuskelzellen in der Zellkultur durchgeführt. Beide „Omics“ Technologien sind komplementär und können durchaus unterschiedliche Ergebnisse liefern, wie im Kapitel 2.1 (Abbildung 1) kurz erörtert wurde [5]. Die Analyse von Zellkulturen ermöglicht es im Gegensatz zu Gewebeanalysen, den zu untersuchenden Zelltypus zu definieren und den Einfluss von kontaminierenden Zellen auszuschließen. Weiterhin reduzieren Zellkulturen die Komplexität der Analysen und führen zur Findung von Schlüsselproteinen, die bei einer Gewebeanalyse weitaus schwieriger zu identifizieren wären [5, 28, 32]. Ein gutes Beispiel hierfür ist FGF23. Abbildung 3A zeigt eine über 20-fache Zunahme der FGF23 RNA Expression in Herzmuskelzellen nach OSM Stimulation. Dieses war überraschend, da FGF23 hauptsächlich von Zellen des Knochens produziert werden soll [74, 75]. Um nachzuweisen, dass FGF23 auch von Kardiomyozyten sekretiert wird, wurden die Überstände von Herzmuskelzellkulturen analysiert. Im Überstand von OSM-stimulierten Herzmuskelzellen konnte mittels Western Blot (Abbildung 3B) eine deutlich ausgeprägte Sekretion des FGF23 nachgewiesen werden, während in den beiden Kontrollkulturen nichts nachzuweisen war. Auf die unterschiedlichen Banden des FGF23, die durch intrazelluläre Prozessierung zustande kommen, werde ich im Kapitel 2.4 näher eingehen. Zusammenfassend kann man festhalten, dass Herzmuskelzellen des erwachsenen Tieres FGF23 unter Stress bilden, und dass dieses Protein in die Umgebung abgegeben wird. Es stellt sich jetzt die Frage, ob Herzmuskelzellen auch im Herzen unter pathologischen Bedingungen FGF23 produzieren.

FGF-23 wird von Herzmuskelzellen im insuffizienten Mäuseherzen gebildet

Um die chronische Herzinsuffizienz analysieren zu können, diente ein etablierter Mäusestamm mit der herzspezifischen Überexpression des MCP-1. Der Herzmuskel dieser Tiere ist gekennzeichnet durch eine chronische Infiltration von Monozyten/Makrophagen, was zur Myokarditis und letztendlich zur Herzinsuffizienz führt, an welcher dieser Stamm nach 6 Monaten ver stirbt [14]. Wie man in Abbildung 4 in der Kontrolle erkennen kann, sind Herzmuskelzellen und Gefäße negativ für FGF23. Blau markiert sind die Zellkerne und Rot kennzeichnet die Zellkörper. In den MCP-1 transgenen insuffizienten Mäuseherzen erkennt man einzelne grün markierte Herzmuskelzellen, die positiv für FGF23 sind.

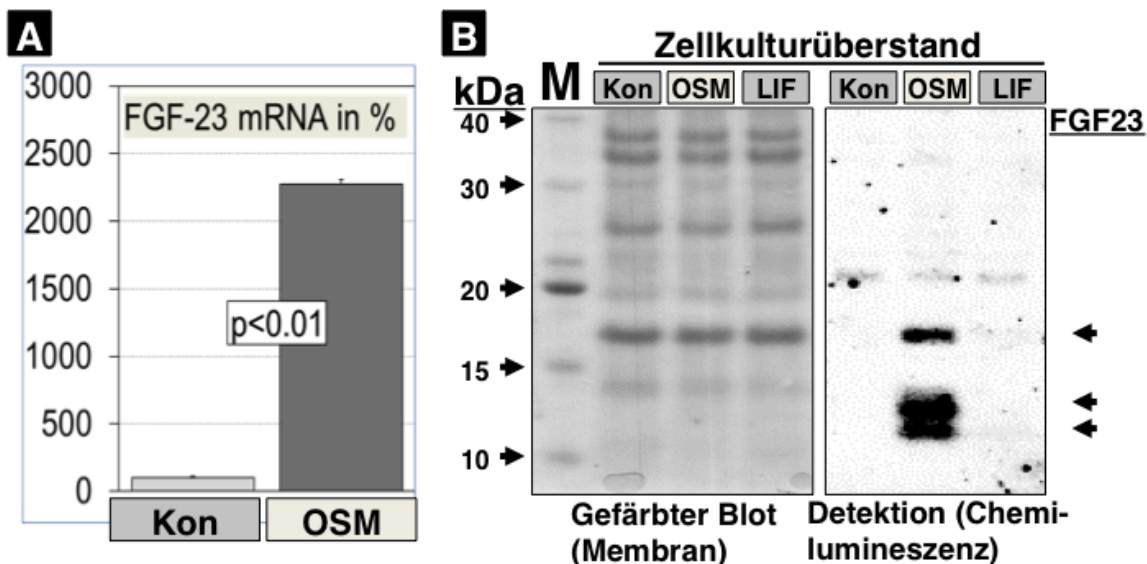


Abbildung 3: Oncostatin M induziert die Expression und Sekretion von FGF23 in Kulturen von adulten Herzmuskelzellen. (A) RNA Quantifizierung von Albumin (Kon) und Oncostatin M (OSM) stimulierten adulten Herzmuskelzellen der Ratte nach 7 Tagen. (B) Western Blot Analyse identifiziert C- und N-terminales FGF23 in Überständen von Oncostatin M stimulierten Herzmuskelzellen. FGF23 ist in LIF stimulierten Zellen nicht nachweisbar. Die gefärbte Membran zeigt die gleichmäßige Ladung von Proteinen. Diese Abbildung wurde übernommen und modifiziert von unserer Publikation [32].

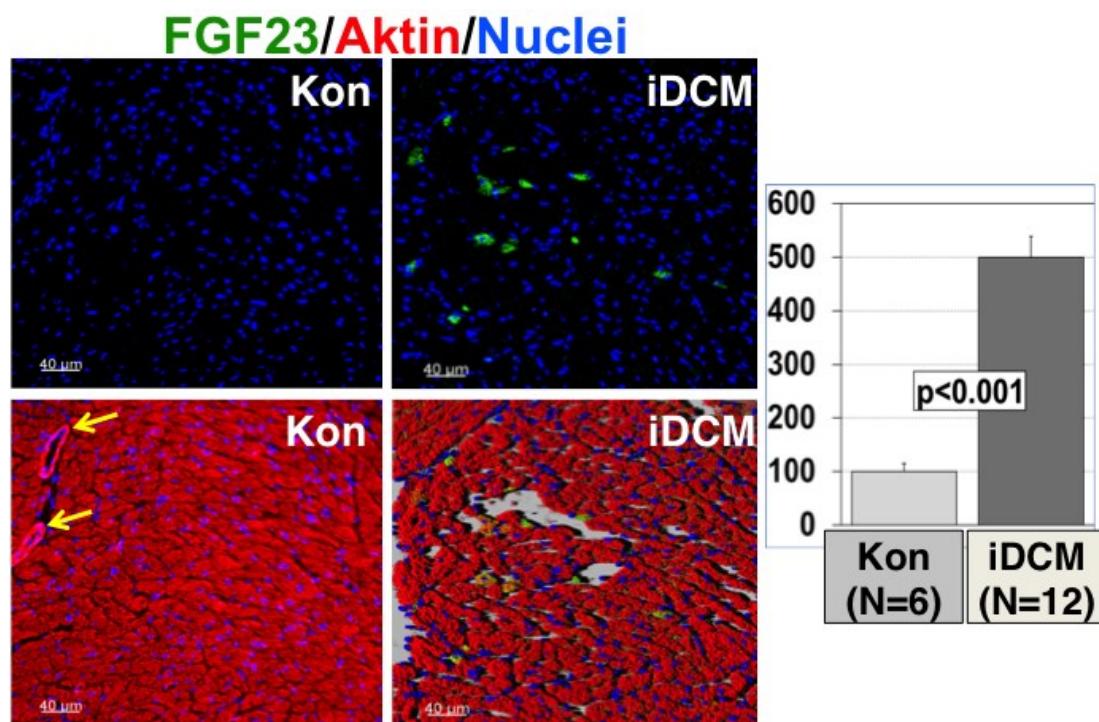


Abbildung 4: FGF23 wird von Herzmuskelzellen im insuffizienten Mäuseherzen gebildet. Konfokale Bilder zeigen FGF23 positive Kardiomyozyten in einer 6 Monate alten Maus mit einer kardiospezifischen Überexpression des MCP-1, die eine inflammatorische dilatative Kardiomyopathie entwickelt (iDCM). Gelbe Pfeile indizieren Gefäße. Die statistische Auswertung der konfokalen Daten zeigt eine deutliche und signifikante Zunahme der Zahl an FGF23 positiven Herzmuskelzellen. Diese Abbildung wurde übernommen von unserer Publikation [32].

FGF23 wird in Herzmuskelzellen von Patienten mit unterschiedlichen Herzerkrankungen gebildet

Um zu zeigen, dass FGF23 auch im insuffizienten Herzen produziert wird, wurde menschliches Myokard von 7 Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie, 9 Patienten mit Myokarditis und 18 Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Die Ejektionsfraktion in diesen Gruppen lag bei unter 24%. Als Kontrolle diente Herzmuskelgewebe aus nichterkrankten Herzen. In [Abbildung 5](#) wird der rechte und linke Ventrikel eines Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie gezeigt, der bis zur Transplantation an ein mechanisches Kreislauf Unterstützungssystem (Ventricular Assist Device) angeschlossen war. Im rechten Ventrikel waren nur einzelne Herzmuskelzellen – vergleichbar mit den Kontrollen – positiv für FGF23. Der linke Ventrikel zeigt eine massive Infiltration hauptsächlich von Makrophagenpopulationen und eine starke Expression von FGF23 in den Kardiomyozyten. In allen drei Patientengruppen mit Herzinsuffizienz konnten signifikant erhöhte Mengen an FGF23 positiven Herzmuskelzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden, wobei Patienten mit Myokarditis die stärkste Expression des FGF23 sowohl auf Protein- als auch RNA Ebene zeigten. In [Abbildung 6](#) ist noch einmal ganz deutlich die Akkumulation des FGF23 (grün) in den rot gefärbten Herzmuskelzellen zu erkennen. Die Präsenz von FGF23 in den Nuklei einiger Zellen im interstitiellen Raum wirft die Frage auf, ob das von Herzmuskelzellen produzierte FGF23 an Nicht-Kardiomyozyten bindet. Dies setzt die Expression des FGF23 Rezeptors (FGFR1c) in diesen Zellen voraus. Um diese Hypothese zu testen, wurde Infarktgewebe der Maus mit einem spezifischen Antikörper für den FGF23 Rezeptor gefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. In [Abbildung 7](#) wird gezeigt, dass Nicht-Kardiomyozyten im Infarktbereich positiv für den FGFR1c sind, während Herzmuskelzellen keine Färbung aufweisen. Die Unterteilung in Herzmuskelzellen, die FGF23 produzieren und Nicht-Kardiomyozyten, die den dazugehörigen Rezeptor produzieren, legt nahe, dass eine Kommunikation zwischen diesen Zellen unter Stress zustande kommt, wahrscheinlich mit dem Ziel, die Regeneration des geschädigten Gewebes voranzutreiben.

Oncostatin M Induces FGF23 Expression in Cardiomyocytes

Richter M, Polyakova V, Gajawada P, Pöling J, Warnecke H, Braun T, Walther T, Kubin T.

J Clin Exp Cardiol S9:003. doi: 10.4172/2155-9880.S9-003

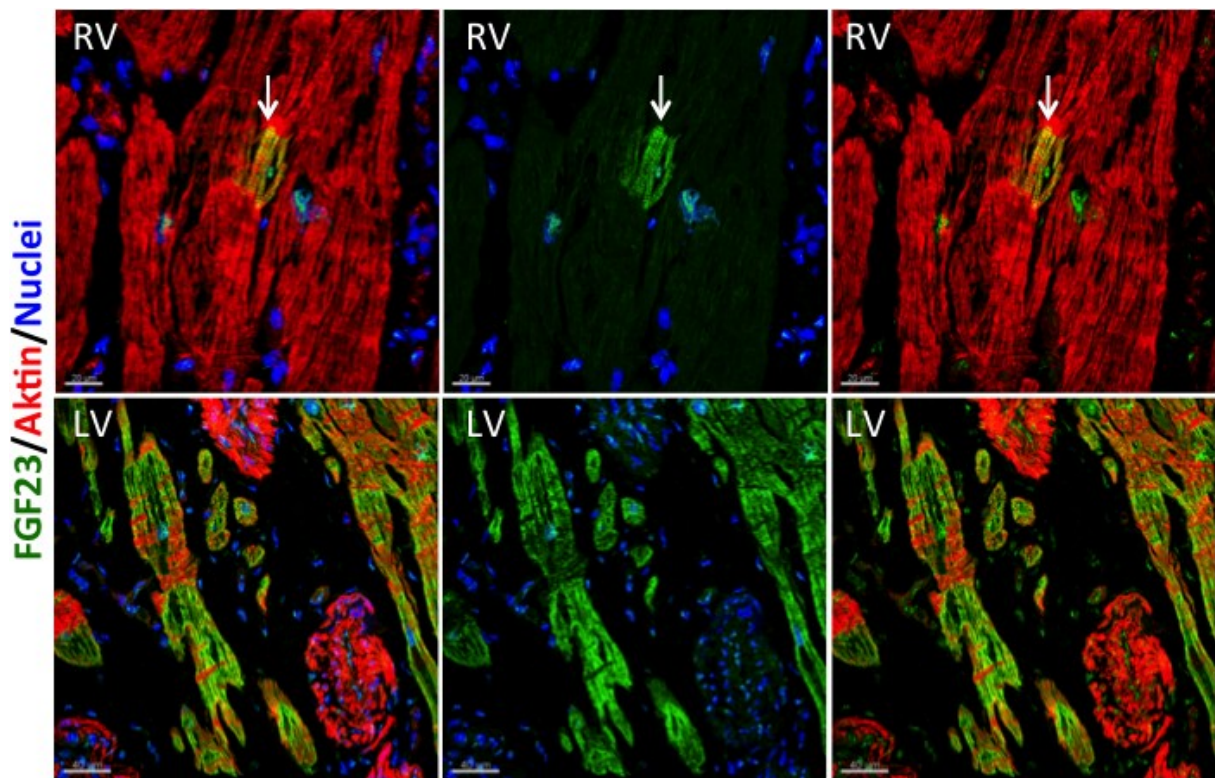


Abbildung 5: FGF23 Expression in einem Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie und einem mechanischem Kreislauf Unterstützungssystem (Assist Device). Konfokale Bilder zeigen eine starke Expression des FGF23 in Kardiomyozyten des linken Ventrikel (LV). Im rechten Ventrikel (RV) sind wenige Herzmuskelzellen positiv und entsprechen einer Normalverteilung (unveröffentlichtes Resultat).

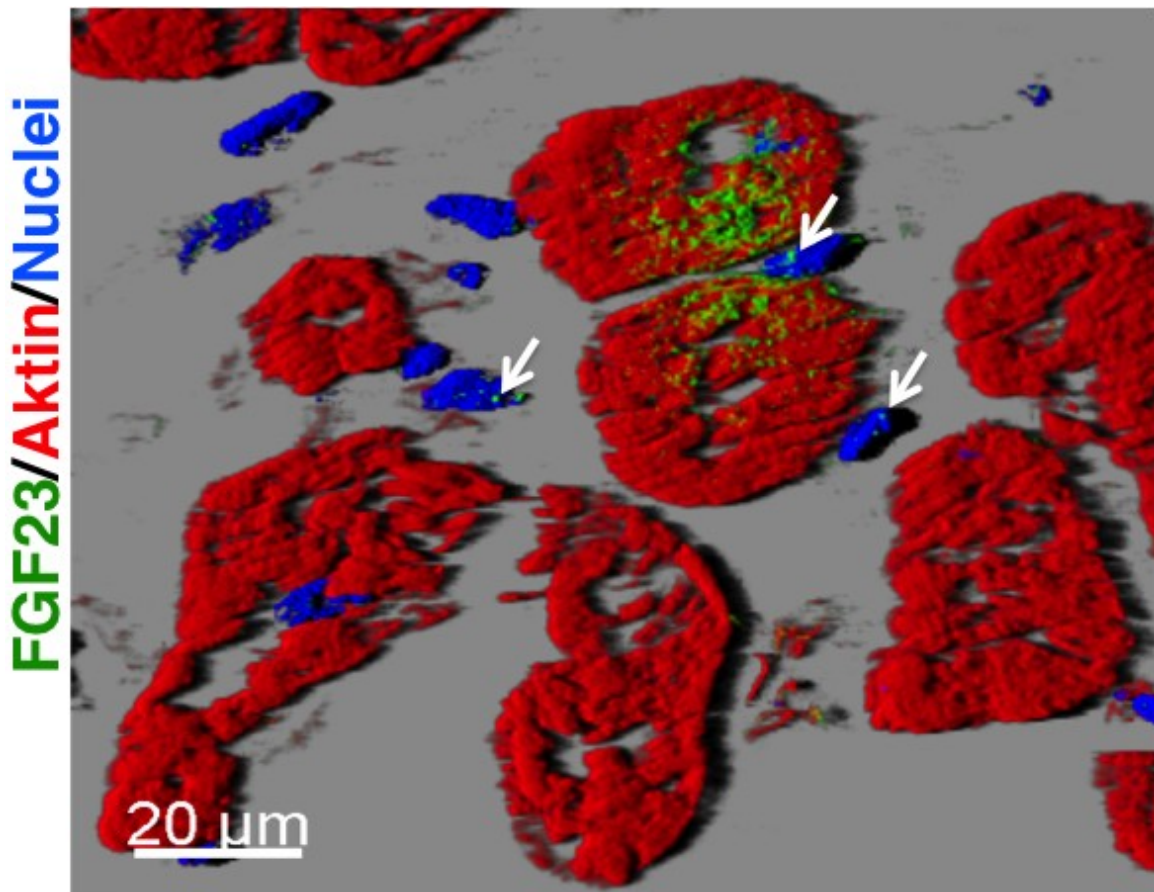


Abbildung 6: *FGF23 wird in Herzmuskelzellen von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie gebildet. Das konfokale Bild zeigt stark positive Herzmuskelzellen im ischämischen Bereich. In einzelnen Nicht-Kardiomyozyten befindet sich FGF23 im Zellkern (DAPI). Diese Abbildung ist übernommen und modifiziert worden von unserer Referenz [32].*

FGFR1c/Aktin/DAPI

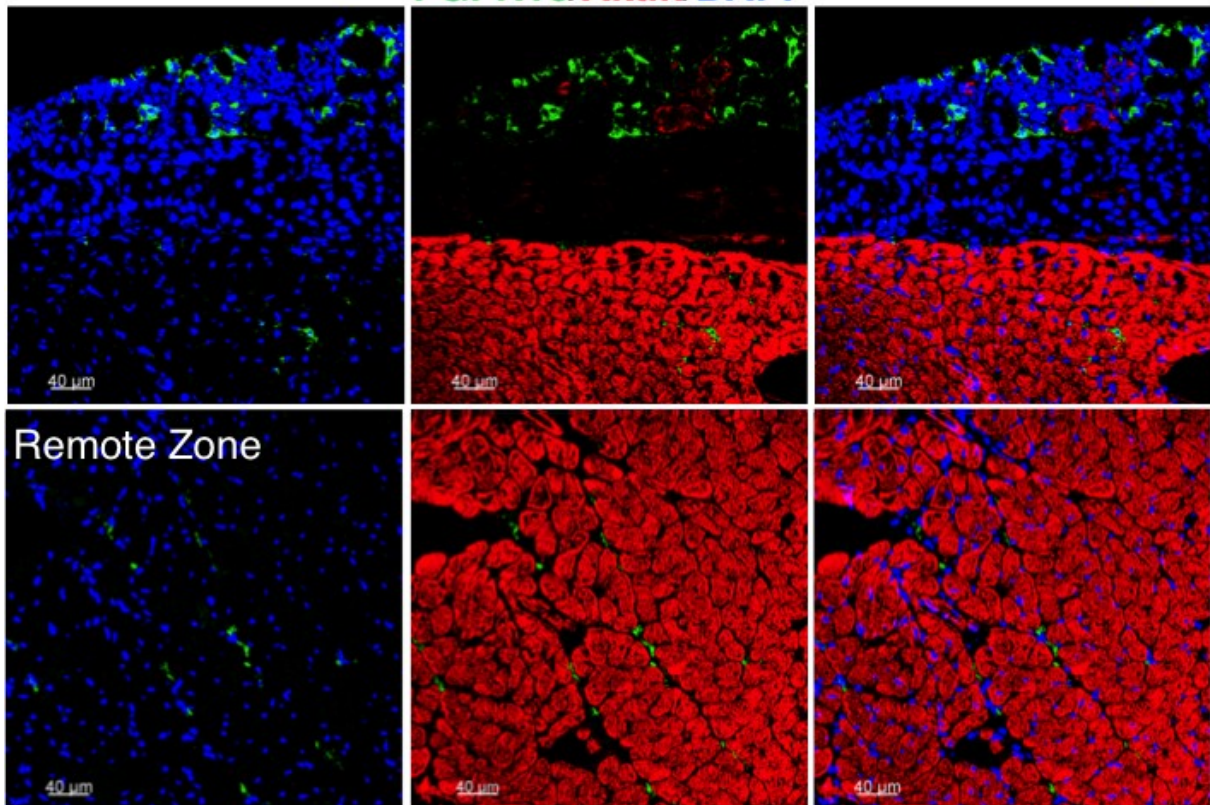


Abbildung 7: Der Rezeptor für FGF-23 wird in Nicht-Herzmuskelzellen der Maus nach Myokardinfarkt gebildet. Dieses konfokale Bild zeigt die massive Akkumulation des FGF23 Rezeptors FGFR1c auf Nicht-Muskelzellen im Infarktbereich während dieser Rezeptor in Herzmuskelzellen nicht vorhanden ist (unveröffentlichtes Resultat). In der Remote Zone finden sich wenige FGFR1c positive Nicht-Muskelzellen.

2.4 Die Freisetzung des FGF23 in die Zirkulation durch das insuffiziente Herz ist Oncostatin M abhängig

Die Konzentration von FGF23 ist in der Perikardflüssigkeit höher als im Serum

Ursprünglich sind gesteigerte Mengen an zirkulierendem FGF23 im Zusammenhang mit einer Nierenerkrankung gesehen worden, aber eine wachsende Anzahl an Studien belegt, dass eine erhöhte Konzentration dieses Phosphatonins auch mit einer Herzerkrankung bei Patienten mit gesunder Niere in Verbindung gebracht werden kann. So konnten erhöhte Mengen an zirkulierendem FGF23 nach einem Infarkt, bei akuter dekompensierter Herzinsuffizienz, bei systolischem Herzversagen und bei älteren Menschen mit erhöhter linksventrikulärer Masse nachgewiesen werden, und sie waren assoziiert mit der Schwere der Herzerkrankung in nichtischämischen Patienten [42, 44, 46, 76, 77]. Wir konnten nachweisen, dass Patienten mit Aortenstenose und präservierter Ejektionsfraktion einen fast dreimal höheren FGF23 Spiegel in der Perikardflüssigkeit als im Serum aufwiesen. Dies deutet darauf hin, dass in solchen Fällen das Herz und nicht der Knochen die primäre Quelle dieses Wachstumsfaktors ist [31]. Weiterhin bestätigten unsere Messungen an Patienten mit verschiedenen Graden an Aortenstenose und Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie, dass die Konzentrationen von FGF23 in der Perikardflüssigkeit deutlich höher als im Serum waren (unveröffentlichte Daten).

Die Freisetzung von FGF23 ist abhängig von einer OSM abhängigen Stat3 Aktivierung

Um nachzuweisen, ob die kardiale Freisetzung des FGF23 bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz vom Oncostatin M Rezeptor und vom Stat3 abhängig ist, diente der MCP-1 transgene Mäusestamm und die Zellkultur. Durch die kardiale Überexpression des Chemokines MCP-1 kommt es zur massiven Infiltration des Herzens durch kardiale Monozyten/Makrophagen, an der die Mäuse infolge einer inflammatorischen dilatativen Kardiomyopathie ab dem sechsten Monat versterben [14]. MCP-1 hat selbst keine Wirkung auf Kardiomyozyten (unveröffentlichte Ergebnisse). In diesem Stamm wurde dann der Oncostatin M Rezeptor durch Einkreuzung der OSMRKO Maus deletiert [16, 31]. Die Serumkonzentration des FGF23 war in dem MCP-1 Stamm 6-mal höher als in den Kontrollmäusen [31] und korreliert mit der erhöhten Expression dieses Wachstumsfaktors im Herzmuskel [32]. Umgekehrt reduzierte die Deletion des Oncostatin M Rezeptors in dem transgenen Stamm die Menge an zirkulierendem FGF23 auf das Niveau der Wildtyp Maus. Die Inaktivierung des OSMR reduzierte außerdem die Dilatation des Herzmuskels, verringerte die Mortalität und verbesserte die linksventrikuläre Funktion [27]. Die Reexpression von ANP, Destrin und Actinin-1 war deutlich reduziert, so dass es zu einer verringerten Dedifferenzierung und Remodellierung der Herzmuskelzellen kam

[31]. Wir haben früher gezeigt, dass die Sekretion von Proteinen von der OSMR induzierten Stat3 Aktivierung abhängt [28] und konnten dies auch für FGF23 in der Zellkultur mittels siRNA gegen Stat3 demonstrieren. Die Deletion des OSMR in der MCP-1 Maus führte zu einer reduzierten Stat3 Signalkaskade. Dieses Resultat passt zur beobachteten geringeren Menge an zirkulierendem FGF23.

Oncostatin M stimulierte Herzmuskelzellen sekretieren C- und N-terminales, aber nicht intaktes FGF23

Die Analyse der FGF23 Fragmente im Überstand von Oncostatin M stimulierten Kardiomyozyten lässt Rückschlüsse auf potentielle Funktionen dieses Wachstumsfaktors im Herzen zu. Wie im Western Blot in [Abbildung 3B](#) gezeigt, konnte überraschenderweise nicht das ganze intakte FGF23 (iFGF23; 28kDa) im Überstand nachgewiesen werden, sondern nur das C- (cFGF23; 18kDa) und das N-terminale (nFGF23; 14 & 12kDa) Peptid. Auf der anderen Seite war das intakte FGF23 nur im Zelllysat zu finden, so dass daraus gefolgert werden kann, dass FGF23 für die Sekretion prozessiert worden ist [31, 32]. Um intakt sezerniert zu werden, bedarf es einer Glykosylierung am T178 innerhalb der Subtilisin-like Proprotein Konvertasestelle (SPC) im FGF23 [78]. Da intaktes FGF23 im Kardiomyozytenlysat nur in der Größe von 28kDa nachgewiesen werden konnte, glykosyliertes aber eine Größe zwischen 32 und 36kDa aufweist [79], ist anzunehmen, dass FGF23 in Oncostatin M behandelten Herzmuskelzellen nicht glykosyliert vorliegt. Weiterhin verhindert möglicherweise eine Phosphorylierung am S180 durch Fam20C diese Glykosylierung und führt zur Proteolyse des SPC-Abschnittes durch Furin [78, 80]. Weil der SPC-Bereich und die Zahl der Aminosäuren im FGF23 in Maus und Ratte identisch mit denen des Menschen (251 Aminosäuren) sind, kann gefolgert werden, dass die FGF23 Fragmente in diesen Spezies die gleiche Länge haben und vergleichbar reguliert werden dürften ([Abbildung 8A](#)). Der Grund für die Prozessierung und kardiale Sekretion des FGF23 ist unklar, aber kürzlich erschienene Publikationen diskutieren eine antagonisierende systemische Funktion der Fragmente. Obwohl das intakte FGF23 eine phosphat-uretische Wirkung hat, könnte die proteolytische Spaltung nicht nur diesen Wachstumsfaktor blockieren, sondern das C-terminale FGF23 könnte auch die Formierung des FGF23/FGFR/Klotho Komplexes unterbinden und somit die Phosphatausscheidung regulieren [81]. In [Abbildung 8](#) fasse ich unsere Ergebnisse zusammen.

Nicht-Kardiomyozyten sind eine zusätzliche Quelle des FGF23 im kranken Herzen

Bisher konnten bei allen Patientengruppen (Myokarditis, ischämische und dilatative Kardiomyopathie und Aortenstenose) FGF23 positive Kardiomyozyten identifiziert werden. Um herauszufinden, ob Herzmuskelzellen die einzige kardiale Quelle des FGF23

sind, wurden kardiale Nicht-Herzmuskelzellen mit OSM und dem Leukämiehemmenden Faktor (LIF) stimuliert. Das humane OSM und LIF liegen auf dem gleichen Chromosom 22q12 und diese „Zwillinge“ sind durch Genduplikation eines gemeinsamen Vorläufers entstanden [82]. Im Gegensatz zum OSM kann LIF den OSMR/gp130 Rezeptor Komplex nicht aktivieren und transduziert seine Signale durch den LIFR/gp130 Komplex, so dass die Aktivitäten dieser beiden Zytokine unterschieden werden können. Kardiomyozyten sind im Vergleich zu Nicht-Kardiomyozyten recht schwer und können durch differentielle Zentrifugation bei jeweils 25G und 100G einfach voneinander getrennt werden [31, 83].

Während im Herzmuskelgewebe von Patienten zuerst keine FGF23 positiven Nicht-Kardiomyozyten identifiziert werden konnten, so war eine 16-fache Zunahme an C-terminalem FGF23 im Überstand der Zellkulturen von Nicht-Kardiomyozyten einen Tag nach OSM Stimulation zu beobachten. Die Charakterisierung der Nicht-Kardiomyozyten mittels Phasen-Kontrast und konfokaler Mikroskopie ergaben Populationen von Endothelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen, wobei Perizyten nur einzeln in diesen Kulturen eingestreut waren. Gegenwärtig versuchen wir herauszufinden, welcher Zelltyp in der Tat für die FGF23 Sekretion nach OSM-Stimulation verantwortlich ist.

Erst kürzlich erschienene Publikationen identifizierten dendritische Zellen und Makrophagen als weitere Quelle des FGF23 [84, 85]. Um zusätzliche kardiale Quellen des FGF23 zu identifizieren, wurden 9 Ventrikel von Patienten mit Myokarditis nach hoher RNA Expression des FGF23 gescreent. Eine 31 jährige Patientin mit einer isolierten kardialen Sarkoidose, die eine DCM entwickelte und auf Grund der geringen EF von unter 25% herztransplantiert wurde, konnte identifiziert werden. Die mikroskopische Beurteilung des Herzmuskelgewebes zeigt wenig nekrotisches und fibrotisches Material aber eine Ansammlung von Granulomen umgeben von zahllosen infiltrierenden Zellen ([Abbildung 9A](#)). Das Zentrum des Granuloms wird besetzt von einer vielkernigen Riesenzelle, die wahrscheinlich durch Fusion von Monozyten/Makrophagen entstanden ist ([Abbildung 9A, B](#)). Überraschenderweise, wurden nur wenig FGF23 positive Kardiomyozyten gefunden ([Abbildung 9C](#)) aber das Granulom war deutlich positiv für FGF23 während die Riesenzellen negativ waren ([Abbildung 9B](#)).

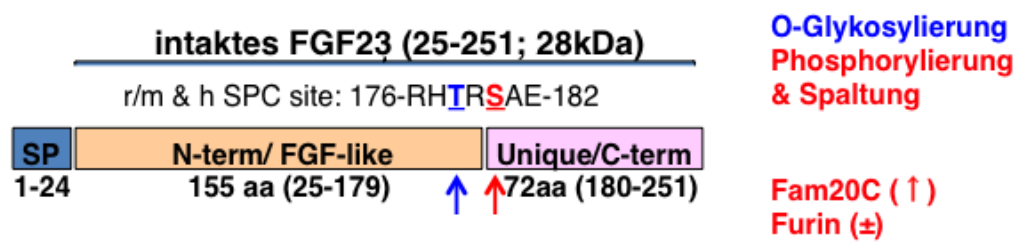
The failing heart is a major source of circulating FGF23 via oncostatin M receptor activation.

Richter M, Lautze HJ, Walther T, Schönburg M, Braun T, Kostin S and Kubin T.

Journal of Heart and Lung Transplantation 34(9), 1211-1214

A

Modell der FGF23 Prozessierung

**B**

Modell der FGF23 Regulation and Sekretion

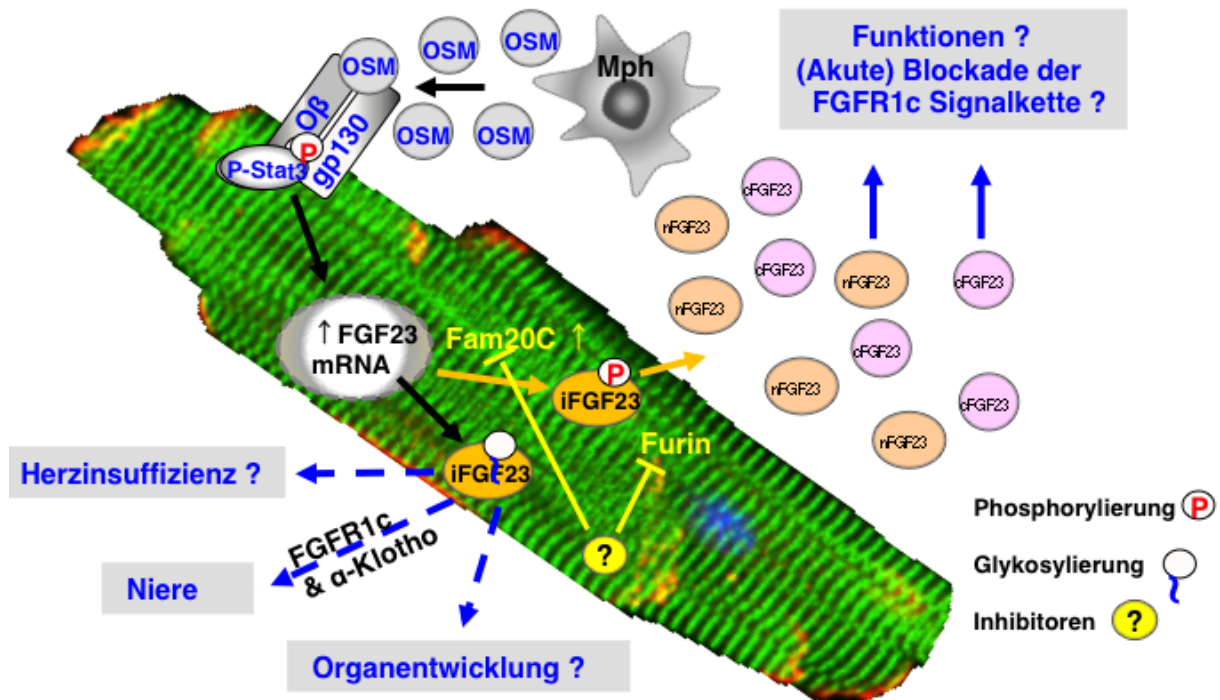


Abbildung 8: Aktivierung der Makrophagen/OSMR/Stat3 Achse in Herzmuskelzellen induziert die Sekretion von fragmentierten FGF23. (A) Schematische Darstellung des FGF23 Proteins. SP (Signal Peptide), iFGF23 (intaktes FGF23), nFGF23 (N-terminales FGF23) und cFGF23 (C-terminales FGF23). Die Sequenz und die individuellen Längen der Fragmente sind angegeben. Die Subtilisin-like Proprotein Konvertasestelle (SPC; 176-182aa) ist identisch zwischen Ratte (r), Maus (m) und Mensch (h). Die SPC Stelle kann glykosyliert (blau) oder phosphoryliert (rot) werden, was jeweils zur Sekretion von intaktem oder fragmentiertem FGF23 führt. (B) Schematische Darstellung der Expression, Modifikation und Sekretion des FGF23. Makrophagen setzen im geschädigten Myokard OSM frei, das über die Aktivierung des Stat3 zur Expression des FGF23 führt. Die Freisetzung des FGF23 oder seiner Fragmente in die Zirkulation kann zu verschiedenen biologischen Effekten führen. Erklärung im Text. Diese Abbildung ist übernommen und modifiziert worden von unserer Publikation [31].

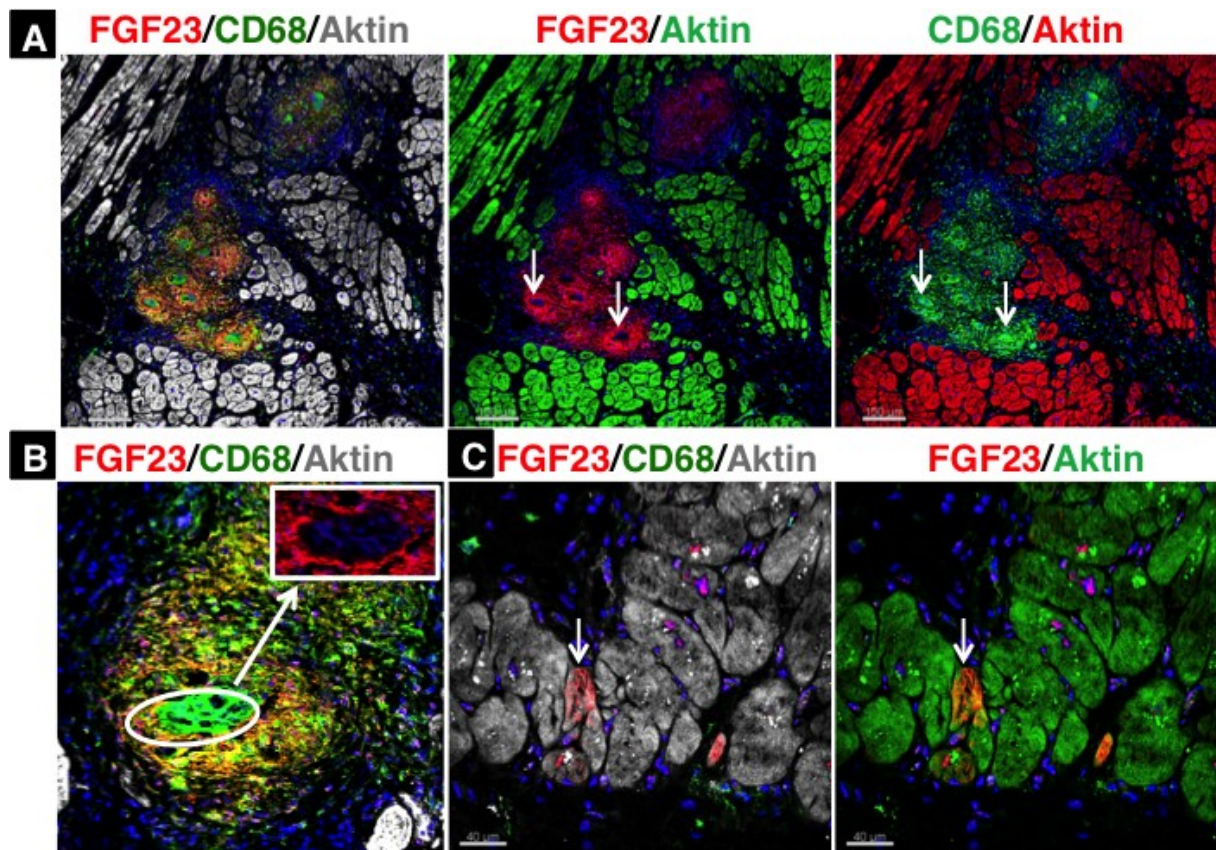


Abbildung 9: Granuloma Zellen sind positiv für FGF23 in Patienten mit isolierter kardialer Sarkoidose. (A) Man sieht deutlich FGF23 positive Granuloma Zellen im Myokard. (B) Riesenzellen sind FGF23 negativ. (C) Wenige Herzmuskelzellen sind positiv für FGF23 (unveröffentlichte Resultate).

2.5 Die Komposition der extrazellulären Proteine beeinflusst die Zahl der Telozyten im menschlichen Myokard

Vor einigen Jahren wurde ein neuer Zelltyp entdeckt, der eine wichtige Rolle in kardialen Regenerationsprozessen zu spielen scheint. Auf diese ursprünglich als „Cajal-like cells“ klassifizierten und heute als Telozyten bezeichneten Zellen möchte ich im Folgenden bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz eingehen.

Der Telozyt ist ein erst vor kurzem neu identifizierter Zelltypus des Interstitiums, der bisher in verschiedenen Organen nachgewiesen werden konnte [86, 87]. Telozyten sind sehr lange, dünne und oft dichotom verzweigte Zellen, die im Wesentlichen charakterisiert sind durch einen geringen zytoplasmatischen Anteil und den extrem langen Ausläufern, den Telopoden. Im Kontrast zu seiner prägnanten Erscheinung in der Licht- und Elektronenmikroskopie gibt es bisher keine spezifischen immunhistologischen Marker zur Identifikation kardialer Telozyten, so dass bisher nur die typische Morphologie und die Expression des Stammzellmarkers c-Kit zur Identifikation herangezogen werden kann [88-90]. Darüber hinaus ist der Telozyt ein seltener Zelltyp und je nach Alter und Erkrankung werden zwischen 3.4 und 45 Telozyten pro mm² im Myokardium gezählt [88]. Um das regenerative Potential von Telozyten in der Pathogenese des menschlichen Herzens abschätzen zu können, analysierten wir linke Ventrikel von 6 Patienten mit Myokarditis (MYO; 43.4 ± 5.8 Jahre), 6 mit dilatativer (DCM; 49.3 ± 6.7 Jahre) und 7 Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM; 54.8 ± 2.4 Jahre). Die Ejektionsfraktionen lagen jeweils bei 23 ± 4.3, 15 ± 2.1 und 21 ± 2.2%. Als Kontrollen dienten ventrikuläre Proben zweier Herzen, die nicht zur Transplantation verwendet werden konnten und 4 Myektomien von Patienten mit Aortenstenose mit guter ventrikulärer Funktion (Ejektionsfraktion >60%). Die Patientenproben wurden jeweils mit der Transmissions-elektronenmikroskopie und der konfokalen Mikroskopie analysiert.

Die Zahl der Telozyten und Telopoden war in allen Patientengruppen auf die Hälfte reduziert. Die erhöhte Apoptose der Telozyten (TUNEL Färbung) im geschädigten Myokardbereich wurde nicht durch erhöhte Zellproliferation (Ki67 Färbung) ausgeglichen (Abbildung 10 & 11). Verschiedenen kürzlich erschienen Publikationen zufolge wurde eine Reduktion von Telozyten auch im alternden menschlichen Herzen [91], im Myokard von Patienten mit systemischer Sklerose [92] und in Ratten nach Myokardinfarkt [93] beobachtet. Umgekehrt reduzierte die Transplantation von Telozyten in den Infarktbereich den Infarkt und verbesserte die myokardiale Funktion [90]. Unsere gegenwärtigen Studien deuten auch auf eine Reduktion der Telozyten bei Patienten mit Aortenstenose während der Transition von kompensatorischer zur dekompensierten linksventrikulären Hypertrophie hin (unveröffentlichte Resultate).

Die Ursache für die erhöhte Apoptose der Telozyten ist weitgehend unklar, aber oxidativer Stress mag ein wesentlicher Faktor sein [94]. Ein weiterer Faktor, der Einfluss auf die Zahl und Morphologie der Telozyten im geschädigten Herzen hat, ist die Komposition der extrazellulären Matrix. In Zonen mit fibrotischem Gewebeersatz oder in Bereichen mit eng gepackten fibrillären Kollagenen beobachteten wir in allen Patientengruppen, dass die Telozyten stark reduziert waren oder ganz fehlten (Abbildung 10 & 11). Hinweise auf die Bedeutung einer Änderung in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und auf die Formation von Telopoden kommen aus Zellkulturanalysen [95]. So soll Laminin wenig und Fibronectin stark die Bildung von Telopoden in der Zellkultur beeinflusst haben. Am stärksten formierten sich Telopoden, wenn Telozyten auf Kollagen kultiviert wurden. Wir folgern daher, dass die veränderte Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und die damit verbundene Fibrose folglich zur Apoptose und zu den ultrastrukturellen Veränderungen der Telozyten beigetragen haben dürften. Hierbei sind vor allem das Schrumpfen, die Verkürzung der Telopoden und die zytoplasmatische Vakuolisierung hervorzuheben (Abbildung 10 & 11). Eine Degeneration der Telozyten kann weiterhin mit einer lokalen Entzündung, einer ischämischen Umgebung und einer erhöhten Expression von iNOS und COX2 in Verbindung gebracht werden [96].

Die physiologischen Konsequenzen einer reduzierten Telozytenpopulation bei Patienten mit Herzinsuffizienz sind nicht geklärt, aber die ausgeprägten 3-dimensionalen Verbindungen dieses Zelltyps im Myokard deuten auf eine wichtige Funktion in der interzellulären Kommunikation durch homo- und heterozelluläre Kontakte hin [97, 98]. Durch die Freisetzung von Mikrovesikeln, Exosomen und microRNAs können Telozyten eine myokardiale Adaptation bei Belastung steuern und zur Regeneration nach einem Infarkt beitragen [88, 93]. Eine weitere Möglichkeit der kardialen Reparatur und Protektion ist die parakrine Freisetzung und Aktivierung pro-angiogener Faktoren in Telozyten wie VEGF und iNOS [90, 96, 99]. Eine Verkleinerung der Stammzellnische durch apoptotische Telozyten wird auch als Ursache einer Reduktion von Stammzellen in herzkranken Patienten diskutiert [96, 100, 101]. Zusammenfassend kann man sagen, dass Telozyten einen neuen Zelltypus mit großem therapeutischem Potential darstellen, deren Bedeutung in der Aufrechterhaltung kardialer Funktion und Regeneration aber noch weiterer Klärung bedarf.

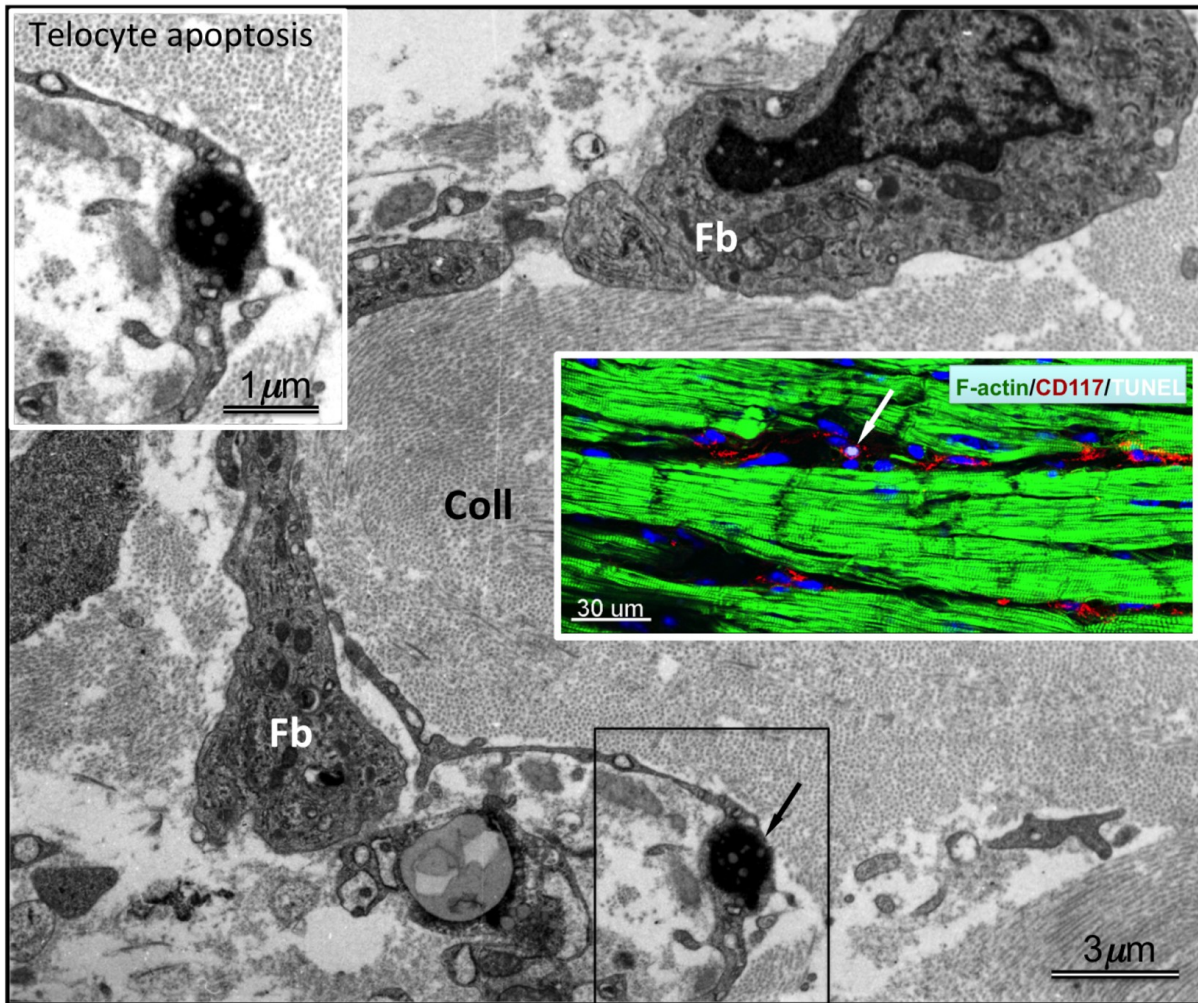


Abbildung 10: Repräsentative elektronenmikroskopische Bilder des linken Ventrikels bei einem Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, die die klassischen Eigenschaften einer apoptotischen Telozyte zeigen (oben links). Die apoptotische Telozyte liegt zwischen dicht gepackten Kollagenfasern (Coll). Fb indiziert einen Fibroblasten. Man beachte, dass der Fibroblast einen großen Zellkörper, gut ausgebildete Mitochondrien und ein raues endoplasmatisches Retikulum hat und das gut von Telozyten zu unterscheiden ist. Die farbige Abbildung zeigt ein konfokales Image von einer apoptotischen (Pfeil) und c-Kit (rot) positiven Telozyte, die von Kardiomyozyten (grün) umschlossen ist. Kerne sind blau. Diese Abbildung ist übernommen und modifiziert worden von unserer Publikation [88].

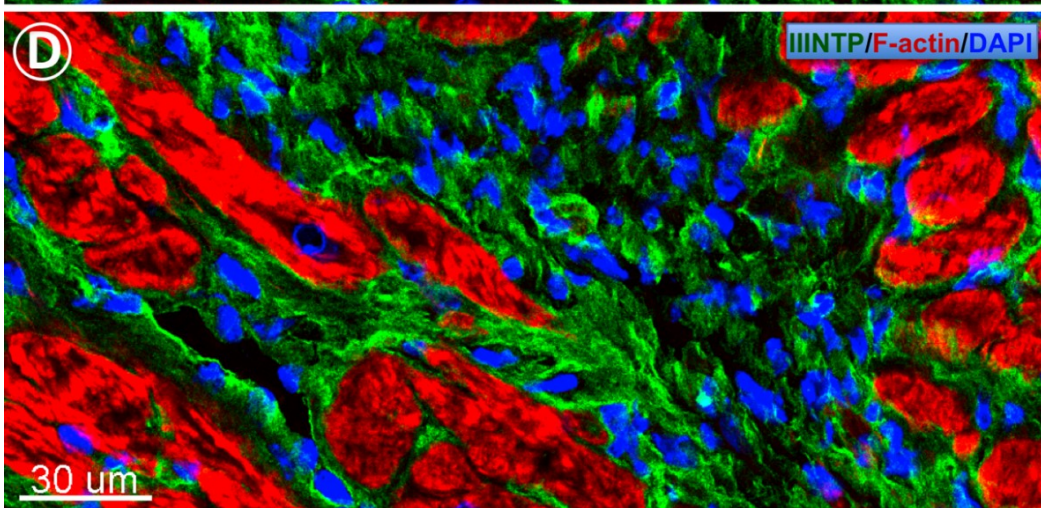
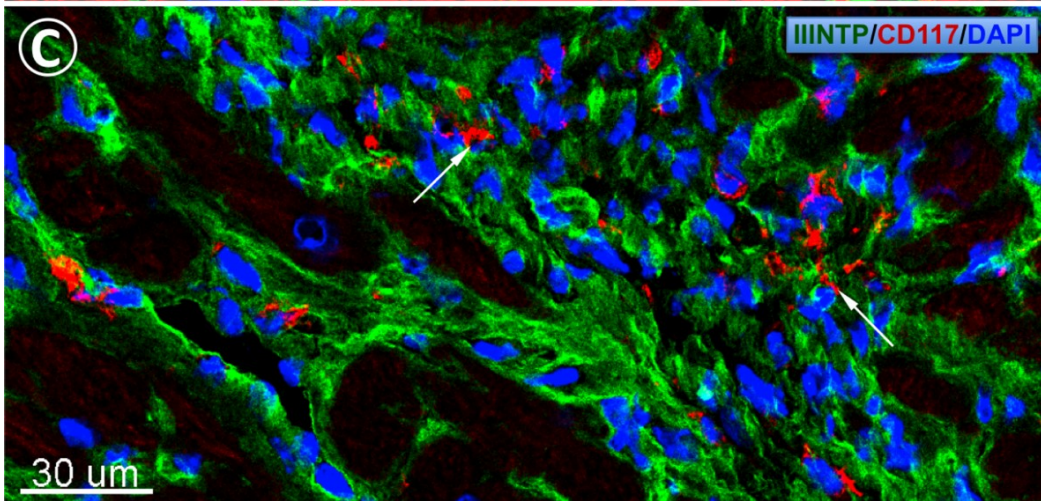
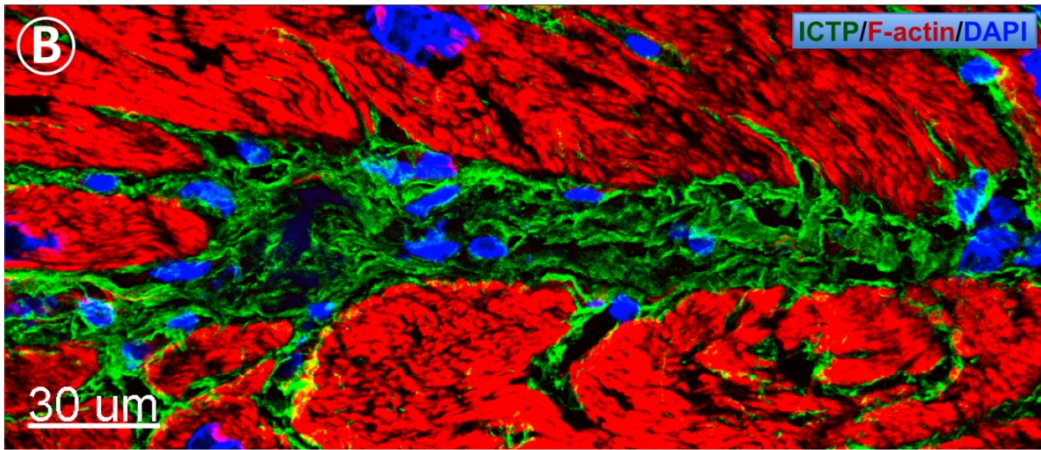
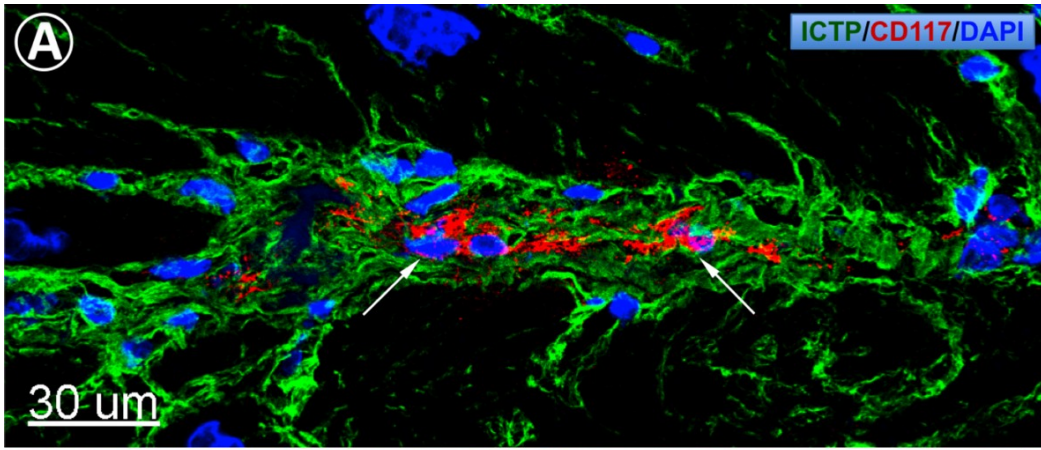


Abbildung 11: Biomarker des Kollagen Stoffwechsels und der Telozyten. (A&B) Konfokale immunfluoreszenzbilder zeigen Telozyten (Pfeile) mit langen Telopoden eingebettet in ICTP (grün) einem Degradationsprodukt des Kollagen I bei einem Patienten mit chronischer Myokarditis. **(C&D)** Konfokale Immunfluoreszenzbilder zeigen matures Kollagen-III (IIINTP; grün) mit Resten von Telopoden (Pfeile) bei einem DCM Patienten. CD117 ist der Telozytenmarker c-Kit. Die Kerne sind blau (DAPI) und F-Aktin markiert prominent Herzmuskelzellen. Diese Abbildung ist übernommen und modifiziert worden von unserer Publikation [88].

The failing human heart is characterized by decreased numbers of telocytes as result of apoptosis and altered extracellular matrix composition.

Richter M, Kostin S.

Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2015 DOI: 10.1111/jcmm.12664

2.6 Zirkulierende und lokale microRNAs bei Patienten mit einem Aneurysma der Aorta ascendens

Aneurysmen der Aorta ascendens können zum einen als Reaktion auf eine Klappenerkrankung entstehen oder zum anderen ihre Ursache in einer Bindegewebserkrankung haben. Löst das Aortenaneurysma eine Herzklappeninsuffizienz aus, kann dies unbehandelt zur Herzinsuffizienz führen. Schlimmstenfalls disseziert das Aortenaneurysma und stellt einen akut lebensbedrohlichen Zustand für den Patienten dar. Im Rahmen unserer Untersuchungen zu neuen Biomarkern und deren möglicher Rolle in der personalisierten Medizin sind wir auf die microRNAs aufmerksam geworden. Ihren Stellenwert und ihren Einfluss auf die Remodellierung der extrazellulären Matrix der Aorta bei Patienten mit Aortenaneurysma zu klären war daher ein Thema meiner Arbeit.

Das Aneurysma der Aorta ist eine sackförmige, permanente Erweiterung der Hauptschlagader, welches auf Grund angeborener (Marfan Syndrom) oder erworbener Veränderungen der Aortenwand entsteht. Bei Fortschreiten dieser Erkrankung kann es zur Ruptur und damit zu akuten Durchblutungsstörungen der Organe und lebensbedrohlichen Blutungen kommen. Trotz kontinuierlicher diagnostischer und therapeutischer Verbesserungen bleibt die Mortalität dieser Erkrankung hoch. Als Hauptursache wird die Arteriosklerose angesehen, während weniger häufig angeborene Bindegewebsschwächen und Infektionen auch Auslöser eines Aortenaneurysmas sein können. Die Pathogenese dieser Erkrankung ist gekennzeichnet durch einen Umbau der extrazellulären Matrix, chronischer Entzündung, einer endothelialen Dysfunktion und einem Switch des Phänotyps von glatten Muskelzellen. Mit der Infiltration des Aneurysmas durch Makrophagen und Lymphozyten werden Zytokine, Chemokine, Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren (TIMPs) freigesetzt, die zur arteriellen Aussackung beitragen. Erst kürzlich veröffentlichte Studien weisen auf eine bedeutende Rolle von microRNAs in der Entstehung der Aneurysmen hin [102].

Die microRNAs sind kleine, hoch konservierte, nichtcodierende, einzelsträngige RNA Moleküle in der Regel von 21-23 Nukleotiden Länge, die die Genexpression von ungefähr 50% des Genoms regulieren [103]. Durch die Bindung der microRNA an die untranslatierte Region der mRNA wird entweder die Translation des Targets inhibiert oder die mRNA selbst abgebaut [104]. Da die microRNA nicht notwendigerweise komplementär zur Ziel-RNA ist und die Expression mehrerer hundert Gene beeinflussen kann, ist diese RNA Spezies in der Lage, ganze Genexpressionsnetzwerke zu regulieren. Darüber hinaus werden microRNAs auch von Zellen in die Zirkulation freigesetzt und können Hinweise auf vaskuläre Schädigungen geben [105]. Daher haben wir neben lokaler auch zirkulierende microRNA bei Patienten mit Aneurysma analysiert.

Die gesamte microRNA wurde mit einem mirVana miRNA Isolationskit aus der Hauptschlagader von 10 Patienten mit einem Aneurysma der Aorta Ascendens (AAA) isoliert. Patienten mit Marfansyndrom wurden von der Studie ausgeschlossen. Als Kontrollgruppe fungierten 9 Patienten mit einer koronaren Bypassoperation, bei denen keine Dilatation der Aorta vorlag. Zirkulierende miRNA wurde mit dem miRNeasy Serum/Plasma Kit (Quiagen) isoliert. cDNA wurde von miRNA-21, miRNA-29b, miRNA-151, miRNA-152, miRNA-155 und miRNA-182 mit einem miRNA Synthese Kit (Life Technologies) hergestellt und eine quantitative RT-PCR wurde mit dem MX3005P real-time PCR Cycler (Stratagene) durchgeführt. Als Referenzgen (house keeping gene) diente RNU6-2-1.

Wir beobachteten eine signifikante Verringerung der Expression von miRNA-21, miRNA-151, miRNA-152, miRNA-155 und miRNA-182, in der Aorta von Aneurysmapatienten. Es ist bekannt, dass die miRNA-21 und die miRNA-155 in der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen eine Rolle spielen, während die miRNA-151 bisher nur im Fokus chronischer inflammatorischer Krankheiten stand [106, 107]. Im Serum ließ sich lediglich nur eine signifikante Verringerung von miRNA-152 nachweisen, während die miRNA-21, miRNA-152, miRNA-155 und miRNA-182 keine relevanten Veränderungen in der Zirkulation aufwiesen. Inwieweit die untersuchten miRNA tatsächlich Einfluss auf die Remodellierung der extrazellulären Matrix im Aneurysma haben, muss noch weiter geklärt werden. Änderungen in der Expression und im zirkulierenden Level von miRNA-29b waren nicht zu beobachten, was nicht konform mit früheren Beobachtungen bei Patienten mit einem Aortenaneurysma ist[108].

Modulation of miRNAs in Aneurysms of the Ascending Aorta: Local versus Circulating Expression Levels

Manfred Richter, Ali El-Sayed Ahmed, Spiros Marinos, Andreas Zierer, Anton Moritz, Andres Beiras-Fernandez and Isabella Werner

Int J Cardiovasc Res doi:10.4172/2324-8602.1000248

3 Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Untersuchung stand die Identifikation von neuen Biomarkern als auch das Verständnis des Umbaus der ECM bei Patienten mit verschiedener kardialer Pathogenese im Vordergrund. Zur Untersuchung und zum Screen von Markern des kardialen Remodellierens wurden Omics-Technologien, Western Blot, ELISA und konfokale Fluoreszenzmikroskopie herangezogen.

Bei Patienten mit Aortenklappenstenose konnten wir zeigen, dass die Menge an Kollagen I und VI mit Abnahme der Ejektionsfraktion bis hin zur Herzinsuffizienz kontinuierlich zunahm. Die Menge an Kollagen III und das matrizelluläre Protein Osteopontin blieben in allen Patientengruppen vergleichbar erhöht. Bemerkenswert war bei zunehmender Reduktion der EF die Verschiebung der relativen Menge vom Kollagen III zum Kollagen I hin. Die erhöhte fibrotische Kollagen I- Ablagerung in der Gruppe 3 kann daher als typisches Merkmal der Entwicklung einer Herzinsuffizienz gedeutet werden.

Weiterhin stiegen die Mengen an Thrombospondin 1&4, Smad3 und TGF- β 1 in der Transition zur dekompensierten linksventrikulären Hypertrophie stark an. TGF- β 3, TAK1 und Smad7 waren in Patienten mit Herzinsuffizienz herunterreguliert. Wir folgern, dass die Balance von pro- (TGF- β 1) und anti-fibrotischen (TGF- β 3) Faktoren, die durch das Ausmaß der ECM Remodellierung widerspiegelt wird, einen starken Einfluss auf die Entwicklung der Herzinsuffizienz hat.

Der Umbau der ECM korrelierte weiterhin mit einer signifikanten Abnahme der kardialen Telozyten im insuffizienten Herzen von Aortenstenosepatienten und wurde auch bei Patienten mit Myokarditis, ischämischer und dilatativer Kardiomyopathie beobachtet. Telozyten sind ein erst kürzlich identifizierter neuer Zelltyp, der durch einen geringen zytoplasmatischen Anteil und extrem lange dünne Ausläufer, den Telopoden, charakterisiert ist. Sie bilden ein Netzwerk, in das neben den Kardiomyozyten auch andere kardiale Zellen eingebunden sind. Dieses Netzwerk scheint eine Rolle als Leitsystem für kardiale Vorläuferzellen in der Herzentwicklung als auch in der Myokardregeneration zu spielen. Mit zunehmender Fibrosierung beobachteten wir eine Zellschrumpfung, eine Verkürzung der Telopoden und eine zytoplasmatische Vakuolisierung der Telozyten, die mit einer verstärkten Apoptose einherging. Wir folgerten, dass die Hemmung der ECM Remodellierung zur Erhaltung des Telozyten-Pools und damit zu einer verbesserten Regeneration führt. Die pathologischen Folgen einer reduzierten Telozytenpopulation sind nicht geklärt, aber der Verlust der ausgeprägten 3-dimensionalen Verbindungen dieses Zelltyps im Myokard deutet auf eine gestörte Funktion in der interzellulären Kommunikation durch homo- und heterozelluläre Kontakte hin.

Im Rahmen unserer Forschung an der extrazellulären Matrix wurden weiterhin zirkulierende und lokale miRNAs bei Patienten mit Aneurysmen der Aorta ascendens untersucht. Wir konnten eine signifikante Verringerung der Expression von miRNA-21, miRNA-151, miRNA-152, miRNA-155 und miRNA-182 in der Aorta von Aneurysmapatienten beobachten. Im Serum ließ sich jedoch nur eine signifikante Verringerung von miRNA-152 nachweisen.

Besondere Aufmerksamkeit widmeten wir der Suche nach neuen Biomarkern, um mit ihrer Hilfe Aussagen zur Prognose und Therapie für Patienten mit unterschiedlichen Herzerkrankungen zu finden. Initiale „Omics“ Studien an OSM stimulierten Herzmuskelzellkulturen vereinfachte das Screening und führte zur Identifikation einer Stat3 abhängigen Sekretion des FGF23. Dieses war überraschend, da FGF23 normalerweise von Zellen des Knochens produziert wird. Wir konnten weiterhin nachweisen, dass Patienten mit Aortenstenose und präservierter Ejektionsfraktion einen fast dreimal höheren FGF23 Spiegel in der Perikardflüssigkeit als im Serum aufwiesen. Dies deutet darauf hin, dass auch das kranke Herz und nicht nur der Knochen die primäre Quelle dieses Wachstumsfaktors ist. Erhöhte Mengen an FGF23 exprimierenden Kardiomyozyten fanden wir auch in Patienten mit ICM und DCM. Die höchste Expression des FGF23 auf RNA- und Proteinebene beobachteten wir in Patienten mit Myokarditis.

Die Identifikation des C- und des N-terminalen FGF23 im Zellkulturüberstand, aber nicht des intakten Proteins, das nur im Zelllysat von Kardiomyozyten nachzuweisen war, deutet auf eine intrazelluläre Phosphorylierung des FGF23 zur Sekretion seiner Peptide hin. Mechanismen dieser Fragmentierung und potentielle Funktionen der FGF23 Peptide wurden diskutiert. Um nachzuweisen, ob die kardiale Freisetzung des FGF23 bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz vom OSM abhängig ist, deletierten wir den OSM Rezeptor in einem transgenen Mäusestamm mit einer kardialen Überexpression des MCP-1. Die Mäuse versterben infolge einer inflammatorischen DCM durch die massive Infiltration von Makrophagen ab dem sechsten Monat. Die stark erhöhte Konzentration des zirkulierenden C-terminalen FGF23 im MCP-1 transgenen Stamm fiel fast auf das Niveau der Wild-typ Maus nach OSMR Deletion und stimmte mit einer geringeren Expression im Herzen überein. Die Inaktivierung des OSMR reduzierte außerdem die Dilatation des Herzmuskels, verringerte die Mortalität und verbesserte die linksventrikuläre Funktion. Die Diskriminierung von intaktem und fragmentiertem FGF23 (mit seit kurzem käuflich erwerblichen ELISA Kits) bei Patienten mit verschiedenen Herzerkrankungen und in Tiermodellen ist Gegenstand gegenwärtiger Untersuchungen.

Die hier zusammengefassten wissenschaftlichen Arbeiten sind im Kontext der personalisierten Medizin zu sehen: individuellen Patienten und Patientengruppen sollen mittels spezifischer Prognose- und Therapieoptionen geholfen werden. Meine Forschungsarbeiten sehen sich daher dem translationalen wissenschaftlichen Ansatz verpflichtet. Mittels „from bench to bedside“ sollen Ergebnisse der Grundlagenforschung möglichst rasch den Patienten zugutekommen und in den klinischen Alltag einfließen. Die Identifikation des FGF23 als ein OSM regulierter endokriner Faktor bei herzkranken Patienten ist ein erster Schritt in diese Richtung.

Summary

In the present investigation the identification of novel biomarkers as well as the understanding of the remodeling of the ECM in patients with different cardiac diseases was of prime interest. For the investigation and the screening of markers of cardiac remodeling “omics” technologies, Western blot, ELISA and confocal fluorescence microscopy were utilized.

We were able to show in patients with aortic stenosis that steady increases in the amount of collagen type I and VI correlated with the reduction in the ejection fraction and the development of heart failure. The amount of collagen type III and the matricellular protein osteopontin stayed comparably elevated in all patients groups. Significant was with decreasing EF the strong shift in the ratio of the relative amounts of collagen I and III demonstrating a major accumulation of collagen I. The strong fibrotic collagen I deposition in group III can be therefore regarded as a typical feature of the development of heart failure.

Furthermore the amounts of thrombospondin 1&4, Smad3 and TGF- β 1 increased during the transition from compensated to decompensated left ventricular hypertrophy. TGF- β 3, TAK1 and Smad7 appeared to be downregulated in patients with heart failure. We conclude that the balance of pro- (TGF- β 1) und anti-fibrotic (TGF- β 3) factors - which mirrors the extent of remodeling of the ECM - has a strong impact on the development of heart failure.

The remodeling of the ECM correlated furthermore with a significant reduction of cardiac telocytes in heart failure patients with aortic stenosis, myocarditis as well as in patients with ICM and DCM. Telocytes are a recently identified new cell type which is mainly characterized by small cytoplasmic compartments and extreme long thin extensions, the telopodes. They are interconnected via cell-to-cell contacts, thereby contributing to the formation of a cellular network in the entire heart. This network appears to play a role as a guide and nurse of myocardial precursors during cardiac development as well as it might orchestrate myocardial regeneration. With increasing fibrosis telocytes were shrinking, telopodes appeared to be shortened and cytoplasmic vacuolization contributed to an increased apoptosis. We conclude that the reduction in remodeling of the ECM will contribute to the maintenance of the pool of telocytes and therefore improve cardiac regeneration. The pathological consequences of a reduced population of telocytes are less clear but the loss of the prominent 3-dimensional connections of this myocardial cell type implies a disturbed function in the intercellular communication by homo- and heterocellular contacts.

As part of our research program of the extracellular matrix we investigated circulating

and local miRNAs in patients with aneurysms of the ascending aorta. We observed a significant reduction in the expression of miRNA-21, miRNA-151, miRNA-152, miRNA-155 und miRNA-182 in the aorta of patients. However, in serum we determined only a significant decrease for miRNA-152.

A special focus of our research was the screen for novel biomarkers in order to improve diagnosis, prognosis and treatment of patients with different cardiac diseases. Initial „Omics“-studies utilizing OSM stimulated cultures of cardiomyocytes simplified the screening procedure and lead to the identification of a Stat3 dependent secretion of FGF23. This has been surprising since FGF23 is regarded as a bone derived growth factor. We furthermore showed that the level of FGF23 in patients with a preserved ejection fraction was 3-fold higher in the pericardial fluid than in serum indicating that the diseased heart and not the bone is the primary source of this endocrine factor. Increased levels of FGF23 expressing cardiomyocytes were also observed in patients with ICM and DCM. We found the highest expression on the RNA as well as on the protein level in patients with myocarditis.

The identification of the C- and N-terminal FGF23 in the cell culture supernatant but not of the intact molecule which was only detected in the cell lysate of cardiomyocytes indicates an intracellular phosphorylation of FGF23 for secretion. The mechanism of fragmentation and potential functions of the FGF23 peptides were discussed. In order to determine whether the cardiac release of FGF23 is dependent on OSM we deleted the OSM receptor in a transgene mouse strain with a cardiac restricted overexpression of MCP-1. These mice die of an inflammatory DCM due to massive infiltration by macrophages after approximately 6 months. The strongly elevated concentration of C-terminal FGF23 in the MCP-1 transgene dropped to almost normal level after OSMR deletion and was consistent with a reduced cardiac expression. The inactivation of the OSMR decreased also the dilation of the myocardium, reduced the mortality and improved left ventricular function. The discrimination between intact and fragmented FGF23 (with recently commercial available ELISA kits) in patients with different cardiac diseases and in animal models is subject of present investigations.

My academic work should be considered in the context of an individualized medicine: Specific prognostic and therapeutic options should become available for individual patients and groups of patients. I see my research work obliged to the translational scientific approach. Through the transfer “from bench to bedside“ results of basic research should be as soon as possible available for patients and enter into daily clinical practice. The Identification of FGF23 as an OSM regulated endocrine factor in patients with heart disease is a first step in this direction.

4 Publikationen

2017

OSM-Stimulated Cardiomyocytes Release a C-Terminal Fragment of FGF23

Maringanti R, Kubin T, Cetinkaya A, Schönburg A, Braun T, Walther T, Kostin S and **Richter M.**

Journal of Cell Science & Therapy; 8:3

DOI: 10.4172/2157-7013.1000273

IF 2016/17: 0.8

The MEK1 inhibitors U0126 and PD98059 block PDGF-AB induced phosphorylation of threonine 292 in porcine smooth muscle cells

Kubin T, Cetinkaya A, Schönburg M, Beiras-Fernandez A, Walther T and **Richter M.**

Cytokine; 95; 51-54

IF 2016/17: 3.5

The effects of polyunsaturated fatty acids and antioxidant vitamins on atrial oxidative stress, nitrotyrosine residues, and connexins following extracorporeal circulation in patients undergoing cardiac surgery.

Petersen F, Rodrigo R, **Richter M**, Kostin S.

Mol Cell Biochem.

doi: 10.1007/s11010-017-3013-1. [Epub ahead of print]

Herztransplantation – update 2017

Rieth A, Classen K, Ziegelhöffner T, Hamm CW, Walther T, **Richter M.**

Hess. Ärzteblatt 4/2017, S 208-213

2016

Mesenchymal stem cells attenuate inflammatory processes in the heart and lung via inhibition of TNF signaling

Martire A, Belema-Bedada F, Uchida S, Pöling J, Krüger M, Warnecke H, **Richter M**, Kubin T, Herold S and Braun B.

Basic Research in Cardiology; 111: 54. doi:10.1007/s00395-016-0573-2

IF 2016/17: 5.3

A Proposal for Early Dosing Regimens in Heart Transplant Patients Receiving Thymoglobulin and Calcineurin Inhibition

Barten MJ, Schulz U, Beiras-Fernandez A, Berchtold-Herz M, Boeken U, Garbade J, Hirt S, **Richter M**, Arjang Ruhpawar A, Schmitto JD, Schönraht F, Schramm R, Schweiger M, Wilhelm M and Zuckermann A.

Transplantation Direct ;2: e81; doi: 10.1097/TXD.0000000000000594;
new journal since 2016

Binding of ATGs to Endothelial Cells In Vivo

Beiras-Fernandez A, Hernandez-Sierra A, Schulz U, **Richter M**, Thein E, Moritz A and Werner I.

Ann Transplantation 17;21:311-6.

IF 2016/17: 1.3

The role of extracellular and intracellular proteolytic systems in aneurisms of the ascending aorta

Werner I, Schack S, **Richter M**, Stock UA, Ahmad Ael-S, Moritz A and Beiras-Fernandez A.

Histol Histopathology 31(5):523-34

IF 2016/17: 2.0

2015

The failing human heart is characterized by decreased numbers of telocytes as result of apoptosis and altered extracellular matrix composition.

Richter M and Kostin S.

Journal of Cellular and Molecular Medicine DOI: 10.1111/jcmm.12664

IF 2016/17: 4.5

The failing heart is a major source of circulating FGF23 via oncostatin M receptor activation.

Richter M, Lautze HJ, Walther T, Schönburg M, Braun T, Kostin S and Kubin T. **Journal of Heart and Lung Transplantation** 34(9), 1211-1214

IF 2016/17: 7.1

Animal Models and “Omics” Technologies for Identification of Novel Biomarkers and Drug Targets to Prevent Heart Failure

Hou Y*, Adrian-Segarra JM*, **Richter M***, Kubin N, Shin J, Werner I, Walther T, Schönburg M, Pöling J, Warnecke H, Braun T, Kostin S and Kubin T.

BioMed Research International Article ID 212910

*Gleichberechtigter Erstautor

IF 2016/17: 2.5

Modulation of miRNAs in Aneurysms of the Ascending Aorta: Local versus Circulating Expression Levels

Manfred Richter, Ali El-Sayed Ahmed, Spiros Marinos, Andreas Zierer, Anton Moritz, Andres Beiras-Fernandez and Isabella Werner.

Int J Cardiovasc Res doi:10.4172/2324-8602.1000248

IF 2015/16: 0.45

Myocardial healing requires Reg3 β -dependent accumulation of macrophages in the ischemic heart

Lörchner H, Pöling J, Gajawada P, Hou Y, Polyakova V, Kostin S, Adrian-Segarra JM, Boettger T, Wietelmann A, Warnecke H, **Richter M**, Kubin T and Braun T.

Nature Medicine Apr; 21(4):353-62.

IF 2016/17: 29.9

2014

Distinct structural and molecular features of the myocardial extracellular matrix remodeling in compensated and decompensated cardiac hypertrophy due to aortic stenosis.

Polyakova V*, **Richter M***, Ganceva N, Lautze HJ, Kamata S, Pöling J, Beiras-Fernandez, Hein S, Szalay Z, Braun T, Walther T and Kostin S.

International Journal of Cardiology (Heart & Vessels) Vol 4, 145-160

*Gleichberechtigter Erstautor

Source normalized impact factor: 0.127

Therapeutic and genetic targeting of the oncostatin M receptor- β prevents inflammatory heart failure.

Pöling J, Gajawada P, **Richter M**, Lörchner H, Polyakova V, Kostin S, Shin J, Boettger T, Walther T, Rees W, Wietelmann A, Warnecke H, Kubin T and Braun T.

Basic Research in Cardiology 109: 396

IF 2015/16: 5.3

2012

Oncostatin M Induces FGF23 Expression in Cardiomyocytes

Richter M, Polyakova V, Gajawada P, Pöling J, Warnecke H, Braun T, Walther T and Kubin T. **J Clin Exp Cardiol** S9:003. doi: 10.4172/2155-9880.S9-003

IF 2016/17: 0.55

2011

Herztransplantation – update 2011

Rieth A*, **Richter M***, Classen K, Mitrovic V, Hamm CW, Walther T.

(*corresponding authors)

Hess. Ärzteblatt 7/2011, S 404-412

2003

Gap junction remodeling and altered connexin43 expression in the failing human heart.

Sawa kostin, Markus Rieger, Sebastian Dammer, Stefan Hein, **Richter M.**, Wolf-Peter Klövekorn, Erwin P. Bauer and Jutta Schaper.

Molecular and Cellular Biochemistry 242; 2003; 135-144

IF 2016/17: 2.7

1994

Myocardial capillaries and autonomic nerves in diabetes: Morphometric study of auricles from bypass surgery biopsies.

Rena Yarom, Stefan Sack, Dan Sapoznikov, **Manfred Richter**, Christof Huth, Andrea Friedl and Jutta Schaper

Cardiovascular Pathology Vol. 1; 43-50

IF 2016/17: 2.4

5 Referenzen

1. Maillet, M., J.H. van Berlo, and J.D. Molkentin, *Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(1): p. 38-48.
2. Swynghedauw, B., *Molecular mechanisms of myocardial remodeling*. Am J Physiol, 1999. **79**(215-262).
3. Szibor, M., et al., *Remodeling and dedifferentiation of adult cardiomyocytes during disease and regeneration*. Cell Mol Life Sci, 2013.
4. Cohn, J.N., R. Ferrari, and N. Sharpe, *Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling*. J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(3): p. 569-82.
5. Hou, Y., et al., *Animal models and "omics" technologies for identification of novel biomarkers and drug targets to prevent heart failure* BioMed Res International, 2015.
6. Katz, A.M., *Cardiomyopathy of overload. A major determinant of prognosis in congestive heart failure*. N Engl J Med, 1990. **322**(2): p. 100-10.
7. Nicolosi, G.L., *Cardiac remodeling and failure after myocardial infarction*. J Cardiovasc Risk, 1994. **1**(4): p. 310-3.
8. Pang, P.S., M. Komajda, and M. Gheorghiade, *The current and future management of acute heart failure syndromes*. European Heart Journal, 2010.
9. Roger, V.L., *Epidemiology of Heart Failure*. Circulation Research, 2013. **113**(6): p. 646-659.
10. Kaye, D.M. and H. Krum, *Drug discovery for heart failure: a new era or the end of the pipeline?* Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(2): p. 127-39.
11. Edwards, A.V., M.Y. White, and S.J. Cordwell, *The role of proteomics in clinical cardiovascular biomarker discovery*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(10): p. 1824-37.
12. Hamm, C.W., *New Serum Markers for Acute Myocardial Infarction*. New England Journal of Medicine, 1994. **331**(9): p. 607-608.

13. Seta, Y., et al., *Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis*. J Card Fail, 1996. **2**(3): p. 243-9.
14. Kolattukudy, P.E., et al., *Myocarditis induced by targeted expression of the MCP-1 gene in murine cardiac muscle*. Am J Pathol, 1998. **152**(1): p. 101-11.
15. Maier, H.J., et al., *Cardiomyocyte-specific I κ B kinase (IKK)/NF- κ B activation induces reversible inflammatory cardiomyopathy and heart failure*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. **109**(29): p. 11794-11799.
16. Poling, J., et al., *Therapeutic targeting of the oncostatin M receptor-beta prevents inflammatory heart failure*. Basic Res Cardiol, 2014. **109**(1): p. 396.
17. Kulkarni, A.B., et al., *Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993. **90**(2): p. 770-774.
18. Shull, M.M., et al., *Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease*. Nature, 1992. **359**(6397): p. 693-699.
19. Hirota, H., et al., *Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress*. Cell, 1999. **97**(2): p. 189-98.
20. Askevold, E.T., et al., *Interleukin-6 Signaling, Soluble Glycoprotein 130, and Inflammation in Heart Failure*. Current Heart Failure Reports, 2014. **11**(2): p. 146-155.
21. Schillaci, G., G. Pucci, and S. Perlini, *From hypertension to hypertrophy to heart failure: the role of cardiotrophin-1*. Journal of Hypertension, 2013. **31**(3): p. 474-476.
22. Yoshida, K., et al., *Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(1): p. 407-11.
23. Zouein, F.A., M. Kurdi, and G.W. Booz, *LIF and the Heart: Just Another Brick in the Wall*. Eur Cytokine Netw, 2013. **24**(1): p. 11-19.

24. Drechsler, J., J. Grotzinger, and H.M. Hermanns, *Characterization of the rat oncostatin M receptor complex which resembles the human, but differs from the murine cytokine receptor*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43155.
25. Hermanns, H.M., *Oncostatin M and interleukin-31: Cytokines, receptors, signal transduction and physiology*. Cytokine & Growth Factor Reviews.
26. Hermanns, H.M., et al., *Contributions of leukemia inhibitory factor receptor and oncostatin M receptor to signal transduction in heterodimeric complexes with glycoprotein 130*. J Immunol, 1999. **163**(12): p. 6651-8.
27. Kubin, T., et al., *Oncostatin m is a major mediator of cardiomyocyte dedifferentiation and remodeling*. Cell Stem Cell, 2011. **9**(5): p. 420-32.
28. Lorchner, H., et al., *Myocardial healing requires Reg3[beta]-dependent accumulation of macrophages in the ischemic heart*. Nat Med, 2015. **21**(4): p. 353-362.
29. Nakamura, K., et al., *Hepatocyte proliferation and tissue remodeling is impaired after liver injury in oncostatin M receptor knockout mice*. Hepatology, 2004. **39**(3): p. 635-44.
30. Poling, J., et al., *The Janus face of OSM mediated cardiomyocyte dedifferentiation during cardiac repair and disease*. Cell Cycle, 2012. **11**(3).
31. Richter, M., et al., *The Failing Heart is a Major Source of Circulating FGF23 via Oncostatin M Receptor Activation*. The Journal of Heart and Lung Transplantation, 2015.
32. Richter, M., et al., *Oncostatin M Induces FGF23 Expression in Cardiomyocytes*. J Clin Exp Cardiol, 2012.
33. Yamashita, T., M. Yoshioka, and N. Itoh, *Identification of a Novel Fibroblast Growth Factor, FGF-23, Preferentially Expressed in the Ventrolateral Thalamic Nucleus of the Brain*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **277**(2): p. 494-498.
34. Dorey, K. and E. Amaya, *FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis*. Development, 2010. **137**(22): p. 3731-42.
35. Degirolamo, C., C. Sabba, and A. Moschetta, *Therapeutic potential of the endocrine fibroblast growth factors FGF19, FGF21 and FGF23*. Nat Rev Drug Discov, 2016. **15**(1): p. 51-69.

36. Wolf, M., *Forging forward with 10 burning questions on FGF23 in kidney disease.* J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(9): p. 1427-35.
37. Gattineni, J., et al., *Regulation of renal phosphate transport by FGF23 is mediated by FGFR1 and FGFR4.* American Journal of Physiology - Renal Physiology, 2014. **306**(3): p. F351-F358.
38. Larsson, T., et al., *Circulating concentration of FGF-23 increases as renal function declines in patients with chronic kidney disease, but does not change in response to variation in phosphate intake in healthy volunteers.* Kidney Int, 2003. **64**(6): p. 2272-9.
39. Damasiewicz, M.J., N.D. Toussaint, and K.R. Polkinghorne, *Fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease: New insights and clinical implications.* Nephrology (Carlton), 2011. **16**(3): p. 261-8.
40. Gutiérrez , O.M., et al., *Fibroblast Growth Factor 23 and Mortality among Patients Undergoing Hemodialysis.* New England Journal of Medicine, 2008. **359**(6): p. 584-592.
41. Gutiérrez, O.M., M. Wolf, and E.N. Taylor, *Fibroblast Growth Factor 23, Cardiovascular Disease Risk Factors, and Phosphorus Intake in the Health Professionals Follow-up Study.* Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2011. **6**(12): p. 2871-2878.
42. Andrukhova, O., et al., *Experimental Myocardial Infarction Upregulates Circulating Fibroblast Growth Factor-23.* Journal of Bone and Mineral Research, 2015. **30**(10): p. 1831-1839.
43. Faul, C., et al., *FGF23 induces left ventricular hypertrophy.* J Clin Invest, 2011. **121**(11): p. 4393-408.
44. Gruson, D., et al., *C-terminal FGF23 is a strong predictor of survival in systolic heart failure.* Peptides, 2012. **37**(2): p. 258-62.
45. Leifheit-Nestler, M., et al., *Induction of cardiac FGF23/FGFR4 expression is associated with left ventricular hypertrophy in patients with chronic kidney disease.* Nephrology Dialysis Transplantation, 2015.
46. Mirza, M.A., et al., *Serum intact FGF23 associate with left ventricular mass, hypertrophy and geometry in an elderly population.* Atherosclerosis, 2009. **207**(2): p. 546-51.

47. Grabner, A., et al., *Activation of Cardiac Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Causes Left Ventricular Hypertrophy*. Cell Metabolism. **22**(6): p. 1020-1032.
48. Ando, H., et al., *Cardiac microvascular endothelial cells express alpha-smooth muscle actin and show low NOS III activity*. Am J Physiol, 1999. **276**(5 Pt 2): p. H1755-68.
49. Kubin, T., et al., *Transforming growth factor-beta1 downregulates beating frequency and remodeling of cultured rat adult cardiomyocytes*. Cell Tissue Res, 2005. **321**(1): p. 57-66.
50. Bonin-Debs, A.L., et al., *Development of secreted proteins as biotherapeutic agents*. Expert Opin Biol Ther, 2004. **4**(4): p. 551-8.
51. Yarbrough, W.M., et al., *Myocardial remodeling with aortic stenosis and after aortic valve replacement: Mechanisms and future prognostic implications*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. **143**(3): p. 656-664.
52. Hein, S., et al., *Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms*. Circulation, 2003. **107**(7): p. 984-91.
53. Hein, S., et al., *Deposition of nonsarcomeric alpha-actinin in cardiomyocytes from patients with dilated cardiomyopathy or chronic pressure overload*. Exp Clin Cardiol, 2009. **14**(3): p. e68-75.
54. Polyakova, V., et al., *Distinct structural and molecular features of the myocardial extracellular matrix remodeling in compensated and decompensated cardiac hypertrophy due to aortic stenosis*. IJC Heart & Vessels, 2014.
55. Rodriguez-Feo, J.A., et al., *Modulation of Collagen Turnover in Cardiovascular Disease*. Current Pharmaceutical Design, 2005. **11**(19): p. 2501-2514.
56. Hopkins, D.R., S. Keles, and D.S. Greenspan, *The bone morphogenetic protein 1/Tolloid-like metalloproteinases*. Matrix Biology, 2007. **26**(7): p. 508-523.
57. Bornstein, P., *Matricellular proteins: an overview*. Journal of Cell Communication and Signaling, 2009. **3**(3-4): p. 163-165.
58. Bujak, M. and N.G. Frangogiannis, *The role of TGF- β signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling*. Cardiovascular Research, 2007. **74**(2): p. 184-195.

59. Li, J. and G. Brooks, *Differential protein expression and subcellular distribution of TGF- β 1, β 2 and β 3 in cardiomyocytes during pressure overload-induced hypertrophy*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**: p. 2213-2224.
60. Rosenkranz, S., et al., *Alterations of β -adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF- β 1*. Am J Physiol, 2002. **283**: p. H1253-1262.
61. Villarreal, F.J. and W.H. Dillmann, *Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF- β 1, fibronectin, and collagen*. Am J Physiol, 1992. **262**: p. H1861-H1866.
62. Schroen, B., et al., *Thrombospondin-2 Is Essential for Myocardial Matrix Integrity: Increased Expression Identifies Failure-Prone Cardiac Hypertrophy*. Circulation Research, 2004. **95**(5): p. 515-522.
63. Frangogiannis, N.G., et al., *Critical Role of Endogenous Thrombospondin-1 in Preventing Expansion of Healing Myocardial Infarcts*. Circulation, 2005. **111**(22): p. 2935-2942.
64. Frolova, E.G., et al., *Thrombospondin-4 regulates fibrosis and remodeling of the myocardium in response to pressure overload*. The FASEB Journal, 2012. **26**(6): p. 2363-2373.
65. O'Connor-McCourt, M.D. and L.M. Wakefield, *Latent transforming growth factor-beta in serum. A specific complex with alpha 2-macroglobulin*. Journal of Biological Chemistry, 1987. **262**(29): p. 14090-9.
66. Ruscetti, F.W., et al., *Transforming Growth Factor β 1*, in *Cytokines*, A.R. Mire-Sluis and R. Thorpe, Editors. 1998, Academic Press: San Diego. p. 415-432.
67. Deten, A., et al., *Changes in Extracellular Matrix and in Transforming Growth Factor Beta Isoforms After Coronary Artery Ligation in Rats*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. **33**(6): p. 1191-1207.
68. Dobaczewski, M., C. Gonzalez-Quesada, and N.G. Frangogiannis, *The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2010. **48**(3): p. 504-511.
69. Lim, H. and Y.Z. Zhu, *Role of transforming growth factor- β in the progression of heart failure*. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2006. **63**(22): p. 2584-2596.

70. Sgonc, R. and G. Wick, *Pro- and anti-fibrotic effects of TGF- β in scleroderma*. *Rheumatology*, 2008. **47**(suppl 5): p. v5-v7.
71. Ask, K., et al., *Progressive pulmonary fibrosis is mediated by TGF- β isoform 1 but not TGF- β 3*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2008. **40**(3): p. 484-495.
72. Stastna, M., et al., *Identification and functionality of proteomes secreted by rat cardiac stem cells and neonatal cardiomyocytes*. *PROTEOMICS*, 2010. **10**(2): p. 245-253.
73. Stastna, M. and J.E. Van Eyk, *Investigating the Secretome: Lessons About the Cells That Comprise the Heart*. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 2012. **5**(1): p. o8-o18.
74. Liu, S., et al., *Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice*. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 2006. **291**(1): p. E38-E49.
75. Quarles, L.D., *Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2008. **118**(12): p. 3820-3828.
76. Andersen, I.A., et al., *Elevation of circulating but not myocardial FGF23 in human acute decompensated heart failure*. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2016. **31**(5): p. 767-772.
77. Poelzl, G., et al., *FGF23 is associated with disease severity and prognosis in chronic heart failure*. *European Journal of Clinical Investigation*, 2014. **44**(12): p. 1150-1158.
78. Tagliabracci, V.S., et al., *Dynamic regulation of FGF23 by Fam20C phosphorylation, GalNAc-T3 glycosylation, and furin proteolysis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014. **111**(15): p. 5520-5525.
79. Angelin, B., Tobias E. Larsson, and M. Rudling, *Circulating Fibroblast Growth Factors as Metabolic Regulators*; A Critical Appraisal. *Cell Metabolism*. **16**(6): p. 693-705.
80. Bhattacharyya, N., et al., *Fibroblast growth factor 23: state of the field and future directions*. *Trends Endocrinol Metab*, 2012. **23**(12): p. 610-8.
81. Goetz, R., et al., *Isolated C-terminal tail of FGF23 alleviates hypophosphatemia by inhibiting FGF23-FGFR-Klotho complex formation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. **107**(1): p. 407-412.

82. Shoyab, M., N. Malik, and P.M. Wallace, *Oncostatin M*, in *Cytokines*, A.R. Mire-Sluis and R. Thorpe, Editors. 1998, Academic Press: San Diego. p. 401-414.
83. Kubin, T., et al., *Microvascular endothelial cells remodel cultured adult cardiomyocytes and increase their survival*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(6 Pt 2): p. H2179-87.
84. Han, X., et al., *Counter-regulatory paracrine actions of FGF-23 and 1,25(OH)2D in macrophages*. *FEBS Letters*, 2016. **590**: p. 53-67.
85. Masuda, Y., et al., *Expression of Fgf23 in Activated Dendritic Cells and Macrophages in Response to Immunological Stimuli in Mice*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2015. **38**(5): p. 687-693.
86. Kostin, S., *Myocardial telocytes: a specific new cellular entity*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2010. **14**(7): p. 1917-1921.
87. Popescu, L.M. and M.-S. Fausone-Pellegrini, *TELOCYTES – a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2010. **14**(4): p. 729-740.
88. Richter, M. and S. Kostin, *The failing human heart is characterized by decreased numbers of telocytes as result of apoptosis and altered extracellular matrix composition*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2015. **19**(11): p. 2597-2606.
89. Rusu, M.C., et al., *Telocytes form networks in normal cardiac tissues*. *Histol Histopathol*, 2012. **27**(6): p. 807-16.
90. Zhao, B., et al., *Intramyocardial transplantation of cardiac telocytes decreases myocardial infarction and improves post-infarcted cardiac function in rats*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2014. **18**(5): p. 780-789.
91. Popescu, L.M., et al., *Telocytes and putative stem cells in ageing human heart*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2015. **19**(1): p. 31-45.
92. Manetti, M., et al., *A loss of telocytes accompanies fibrosis of multiple organs in systemic sclerosis*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2014. **18**(2): p. 253-262.

93. Zhao, B., et al., *Cardiac telocytes were decreased during myocardial infarction and their therapeutic effects for ischaemic heart in rat*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2013. **17**(1): p. 123-133.
94. Enciu, A.-M. and L.M. Popescu, *Telopodes of telocytes are influenced in vitro by redox conditions and ageing*. Molecular and Cellular Biochemistry, 2015. **410**(1): p. 165-174.
95. Niculite, C.M., et al., *Dynamics of telopodes (telocyte prolongations) in cell culture depends on extracellular matrix protein*. Molecular and Cellular Biochemistry, 2015. **398**(1): p. 157-164.
96. Kostin, S., *Cardiac telocytes in normal and diseased hearts*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2016. **55**: p. 22-30.
97. Gherghiceanu, M. and L.M. Popescu, *Heterocellular communication in the heart: electron tomography of telocyte-myocyte junctions*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2011. **15**(4): p. 1005-1011.
98. Gherghiceanu, M. and L.M. Popescu, *Cardiac telocytes — their junctions and functional implications*. Cell and Tissue Research, 2012. **348**(2): p. 265-279.
99. Manole, C.G., et al., *Experimental acute myocardial infarction: telocytes involvement in neo-angiogenesis*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2011. **15**(11): p. 2284-2296.
100. Cesselli, D., et al., *Effects of Age and Heart Failure on Human Cardiac Stem Cell Function*. The American Journal of Pathology. **179**(1): p. 349-366.
101. Wang, F., et al., *Telocytes in liver regeneration: possible roles*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2014. **18**(9): p. 1720-1726.
102. Fu, X., et al., *MicroRNAs: Novel Players in Aortic Aneurysm*. BioMed Research International, 2015. **2015**.
103. Ambros, V., *The functions of animal microRNAs*. Nature, 2004. **431**(7006): p. 350-355.
104. Guo, H., et al., *Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels*. Nature, 2010. **466**(7308): p. 835-840.
105. Fichtlscherer, S., et al., *Circulating MicroRNAs in Patients With Coronary Artery Disease*. Circulation Research, 2010. **107**(5): p. 677-684.

106. Cheng, Y. and C. Zhang, *MicroRNA-21 in Cardiovascular Disease*. Journal of Cardiovascular Translational Research, 2010. **3**(3): p. 251-255.
107. Haque, R., et al., *MicroRNA-152 represses VEGF and TGF β 1 expressions through post-transcriptional inhibition of (Pro)renin receptor in human retinal endothelial cells*. Molecular Vision, 2015. **21**: p. 224-235.
108. Boon, R.A., et al., *MicroRNA-29 in Aortic Dilation: Implications for Aneurysm Formation*. Circulation Research, 2011. **109**(10): p. 1115-1119.

6 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Böning, Direktor der Klinik für Herz- Kinderherz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen, möchte ich an allererster Stelle recht herzlich für die Möglichkeit der Habilitation unter seiner Betreuung danken. Ein ganz besonderer Dank gebührt meinem Freund und wissenschaftlichen Weggefährten Dr. Thomas Kubin. Sein Enthusiasmus für die Forschung, seine enorme wissenschaftliche Kompetenz sowie sein immerwährender Optimismus und seine kontinuierliche Unterstützung in der Bearbeitung wissenschaftlicher Fragestellungen haben mir auf dem Weg zur Habilitation sehr geholfen.

PD Dr. Sawa Kostin danke ich für die Unterstützung in der Bearbeitung wissenschaftlicher Fragestellungen, und dass er mir mit seiner hervorragenden wissenschaftlichen Expertise zur Seite stand.

Der Arbeitsgruppe gilt mein herzlichster Dank. Ohne das Engagement der Mitarbeiter und ihre konstruktiven Anregungen wären viele der vorliegenden Ergebnisse nicht möglich gewesen. Im Labor waren oder sind aktiv tätig: Brigitte Matzke, Beate Grohmann und Renate Möhren als MTAs; Ranganath Maringanti, Hans- Jürgen Lautze und Victoria Polyakova als wissenschaftliche, bzw. ehemalige wissenschaftliche Mitarbeiter. Frau Brigitte Matzke danke ich besonders für Ihre exzellenten immunhistologischen Arbeiten.

Für die wissenschaftliche Kooperation und dem interdisziplinären Austausch „from bench to bedside“ möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Braun, Direktor am Max- Planck- Institut für Herz- und Lungenforschung Bad Nauheim, bei Herrn Prof. Dr. Beiras und Herrn Prof. Dr. Stock von der Johann Wolfgang Goethe- Universität Frankfurt, sowie bei Herrn Prof. Dr. Gattenlöhner, Direktor des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen, bedanken. Allen Mitarbeitern in den entsprechenden Arbeitsgruppen, die hier nicht explizit erwähnt wurden, die Arbeit aber dennoch unterstützt haben, möchte ich ebenfalls auf das allerherzlichste danken.

Herrn Prof. Dr. Ghofrani, Herrn Prof. Dr. Hamm, Herrn Prof. Dr. Schönburg und Herrn Jung gilt mein Dank für Ihre Unterstützung in dem Prozess der Einreichung meiner Habilitation.

Für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Umsetzung der experimentellen Arbeiten danke ich der Stiftung William G. Kerckhoff Herz- und Rheumazentrum Bad Nauheim, der Abt. Herzchirurgie der Kerckhoff- Klinik Bad Nauheim und deren Direktor Herrn Prof. Dr. Walther, dem Verein der Freunde und Förderer der Kerckhoff- Klinik und dessen Vorsitzender Frau Dr. Madlener.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich jederzeit geduldig und liebevoll unterstützt hat. Ohne ihren Rückhalt wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

7 Erklärung

gem. § 5 Abs. 1 Nr. 11 HO

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit bzw. die mir zuzuordnenden Teile im Rahmen einer kumulativen Habilitationsschrift, selbstständig und ohne zulässige 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. Ich versichere, dass ich für die nach § 2 (3) der Habilitationsordnung angeführten bereits veröffentlichten Originalarbeiten als Erst- oder Seniorautor fungiere, da ich den größten Teil der Daten selbst erhoben habe, für das Design der Arbeiten verantwortlich bin und die Manuskripte maßgeblich gestaltet habe. Für alle von mir erwähnten Untersuchungen habe ich die in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegten Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass alle an der Finanzierung der Arbeiten beteiligten Geldgeber in den jeweiligen Publikationen genannt worden sind. Ich versichere außerdem, dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Weise einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde oder Gegenstand eines anderen Prüfungsverfahrens war. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Bad Nauheim, den 6. Juli 2017

Dr. Manfred Richter