

**Relevanz und Funktion des N-terminalen Fragmentes des kardialen  
Myosin-bindenden Protein C nach myokardialer Ischämie**

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

vorgelegt von Yogeswaran, Athiththan  
aus Leer (Ostfriesland)

Gießen, 2022

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**  
Abteilung für experimentelle Kardiologie

Gutachter: Privatdozent Dr. Christian Troidl

Gutachter: Professor Dr. Klaus-Dieter Schlüter

Tag der Disputation: 11. Juli 2022

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Das kardiale Myosin-bindende Protein C .....	1
1.2 Das akute Koronarsyndrom .....	2
1.2.1 Biomarker für das akute Koronarsyndrom .....	2
1.2.2 cMyBP-C: Ein Biomarker für verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen .	3
1.3 Das N-terminale Fragment des cMyBP-C: C0-C1f .....	3
1.4 Prognose des akuten Koronarsyndroms .....	4
1.5 Pathophysiologie des Myokardinfarktes .....	5
1.5.1 Grundlegende Pathophysiologie .....	5
1.5.2 Rolle der Fibroblasten nach einem Myokardinfarkt .....	6
1.6 Pathophysiologische Relevanz des C0-C1f .....	10
1.7 Ziel dieser Arbeit .....	12
<b>2. Materialien und Methoden</b> .....	<b>13</b>
2.1 Materialien .....	13
2.2 Methoden .....	20
2.2.1 Ethische Grundsätze .....	20
2.2.2 Produktion der N-terminalen Fragmente des cMyBP-C .....	20
2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Nano-Drop .....	20
2.2.4 Proteinanalysen mittels Western Blots .....	20
2.2.5 Immunhistochemische Färbungen .....	22
2.2.6 Depletion von cMyBP-C mittels magnetischer Beads .....	23
2.2.7 Isolation, Kultivierung und Stimulation von murinen Kardiomyozyten und Fibroblasten .....	24
2.2.8 Kultivierung und Stimulation humaner Fibroblasten .....	26
2.2.9 Inhibition verschiedener Signalwege in humanen Fibroblasten .....	27
2.2.10 Quantex TNF- $\alpha$ Assay .....	27
2.2.11 RNA Isolation und quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion ...	28
2.2.12 Microarray Analysen .....	31
2.2.13 Statistische Analysen .....	31

<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
3.1 Nachweis von cMyBP-C und C0-C1f im Menschen.....	33
3.1.1 Charakterisierung der verwendeten Antikörper.....	33
3.1.2 Detektion von cMyBP-C und C0-C1f.....	35
3.2 Einfluss von C0-C1f auf Fibroblasten .....	36
3.2.1 Etablierung der Isolation von murinen kardialen Fibroblasten .....	37
3.2.2 Einfluss von C0-C1f auf primäre murine kardiale Fibroblasten .....	40
3.2.3 Einfluss von C0-C1f auf humane Fibroblasten .....	44
3.2.4 Wechselseitiger Einfluss von C0-C1f und TGF- $\beta$ in humanen Fibroblasten	56
3.2.5 Einfluss von C0-C1f auf Signalwege in Fibroblasten.....	63
3.2.6 Inhibition der Effekte von C0-C1f auf humane Fibroblasten.....	66
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>70</b>
4.1 Freisetzung von C0-C1f nach myokardialer Ischämie.....	70
4.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	70
4.1.2 Diskussion der Ergebnisse.....	71
4.2 Pathophysiologische Rolle des freigesetzten C0-C1f .....	72
4.2.1 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	73
4.2.2 Diskussion der Methodik.....	75
4.2.3 Diskussion der Ergebnisse.....	76
4.3 Limitationen .....	86
4.4 Schlussfolgerung und Ausblick .....	87
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>89</b>
5.1 Zusammenfassung (Deutsch) .....	89
5.2 Abstract (English).....	91
<b>6. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>93</b>
<b>7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>95</b>
7.1 Abbildungsverzeichnis.....	95
7.2 Tabellenverzeichnis .....	98
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>99</b>
<b>9. Publikationsverzeichnis.....</b>	<b>112</b>

<b>10. Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>115</b>
<b>11. Danksagung.....</b>	<b>116</b>



## 1. Einleitung

Kardiale Erkrankungen gehören zu den Haupttodesursachen in der westlichen Gesellschaft [127]. Hierbei spielen insbesondere das akute Koronarsyndrom (ACS), das chronische Koronarsyndrom (CCS) sowie Kardiomyopathien eine wichtige Rolle [52, 66, 125]. Diesen Erkrankungen ist eine zugrundeliegende inflammatorische Komponente gemein [68, 131]. Ätiologisch sowie diagnostisch nimmt das kardiale Myosin-bindende Protein C (cMyBP-C, kodiert durch das Gen *MYBPC3*) eine zunehmend zentralere Rolle in diesen Erkrankungen ein [6, 57-61, 92]. Insbesondere ist dies bei der hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) der Fall, da 40 – 50 % aller HCM verursachenden Mutationen im *MYBPC3* vorliegen [19].

### 1.1 Das kardiale Myosin-bindende Protein C

Das 140 kDa schwere cMyBP-C ist ein Strukturprotein der Kardiomyozyten und besteht aus 1273 Aminosäuren (Abbildung 1) [65, 117, 153].

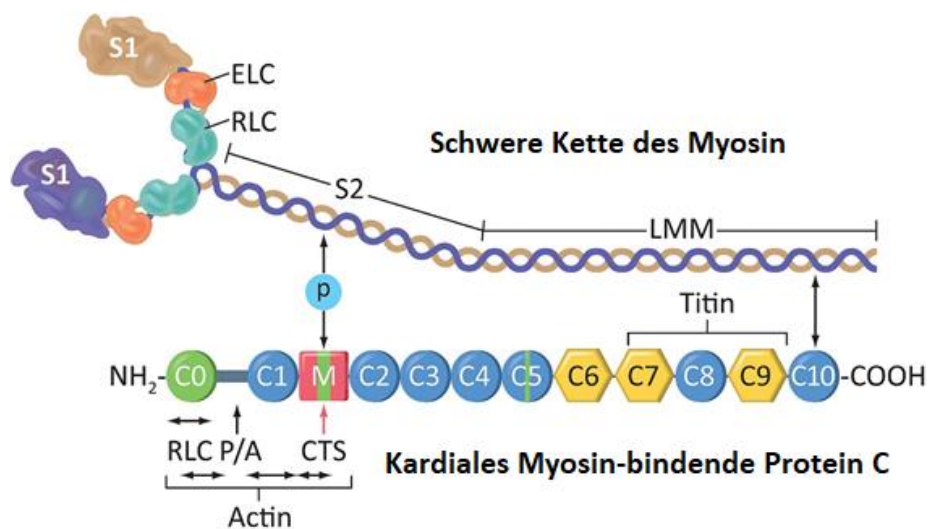


Abbildung 1: Schematische Darstellung des kardialen Myosin-bindenden Protein C und dessen Interaktionsstellen mit Myosin, Aktin sowie Titin, modifiziert nach [149].

cMyBP-C ist in der Lage, sowohl Myosin als auch Aktin und Titin zu binden (Abbildung 1) [117, 153]. Deshalb ist cMyBP-C essenziell für die adäquate Kontraktilität von Kardiomyozyten [9]. Durch Phosphorylierung des cMyBP-C via Protein Kinase A und C sowie durch die Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-aktivierte Kinase II kann die Kontraktilität der Kardiomyozyten beeinflusst werden [9]. Dephosphorylierung des cMyBP-C kann in diesem Zusammenhang über vermehrte Degradation des Proteins zur Herzinsuffizienz

führen [9]. Konkordant führen Mutationen im *MYBPC3* zu verschiedenen kardialen Erkrankungen. Es existieren diverse Tiermodelle, in denen *knock-in* Mutationen im *MYBPC3* zur dilatativen Kardiomyopathie (DCM) führen [94, 95]. Inflammation ist hierbei einer der wesentlichen Treiber für die Entwicklung der DCM [88]. In Tiermodellen zeigte sich interessanterweise, dass die zugrundeliegende Inflammation unter anderem direkt durch die *MYBPC3* Mutation vorangetrieben wird [88].

Neben dem cMyBP-C, welches ausschließlich in Kardiomyozyten vorkommt, existieren in der Skelettmuskulatur weitere Isoformen des Myosin-bindenden Proteins (*MYBPC1*, *MYBPC2*). Die N-terminale C0-Domäne, die Linker-Region zwischen der C0- und C1-Domäne sowie eine veränderte C5-Domäne erlauben eine sichere Differenzierung zwischen der kardialen und der skelettalen Isoform [153]. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde der Nutzen von cMyBP-C als neuer kardialer Biomarker evaluiert.

### **1.2 Das akute Koronarsyndrom**

Unter der Arbeitsdiagnose „ACS“ werden verschiedene akut lebensbedrohliche Krankheiten zusammengefasst, welche sich aufgrund ihrer klinischen Präsentation nicht eindeutig differenzieren lassen [22, 52]. Bei diesen Erkrankungen handelt es sich um die instabile Angina pectoris, den Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI), den ST-Hebungsinfarkt (STEMI) sowie den plötzlichen Herztod [22, 52]. Klinisch präsentieren sich diese Patienten typischerweise mit pektanginösen Beschwerden [22, 52]. Die Patienten durchlaufen anschließend unter der Arbeitsdiagnose „ACS“ einen standardisierten Algorithmus [22, 52, 66, 125]. Falls keine Myokardinfarkt-typischen Zeichen im Elektrokardiogramm vorhanden sind, werden verschiedene biochemische Tests zur Detektion von Biomarkern zwecks Diagnosesicherung oder Ausschluss eines ACS benötigt [22, 52, 66, 125].

#### **1.2.1 Biomarker für das akute Koronarsyndrom**

Biomarker wie das Troponin T (TnT) sind körpereigene Moleküle, die in Plasma- oder Serumproben gemessen werden können und unter anderem das Vorhandensein einer Erkrankung vorhersagen [136]. Daher sind diese objektive Indikatoren für die Präsenz einer Erkrankung [136]. Relevante ACS Biomarker sind die Troponine (Troponin I und T), die Kreatinkinase (CK gesamt sowie die Isoform CK-MB) und die Laktatdehydrogenase (LDH) [20]. Diese Marker haben gemein, dass die



Freisetzungskinetik ihr jeweiliges Maximum nach 18 – 24 Stunden (Troponine und CK) bzw. nach 24 – 28 Stunden (LDH) erreicht [20]. Diese verzögerte Freisetzung nach einem ischämischen Ereignis, insbesondere des klinischen Goldstandards Troponin, führt zu der Problematik, dass bei vielen Patienten initial nicht zwischen einem ACS und einem Ausschluss eines ACS differenziert werden kann [63]. Dies führt zu einer verlängerten, prinzipiell vermeidbaren, Verzögerung des Patientenmanagements [61, 125]. Der Zeitraum zwischen initialer Präsentation mit Angina pectoris und Diagnosestellung ist jedoch entscheidend, da das Überleben mit der Dauer zwischen Einsetzen der Symptome und der Revaskularisation (im Sinne einer perkutanen Koronarintervention (PCI) oder chirurgischen Behandlung) invers korreliert [1, 26, 102, 161].

### **1.2.2 cMyBP-C: Ein Biomarker für verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen**

Patienten mit einer hypertrophen obstruktiven Kardiomyopathie, die sich einer transkoronaren Ablation der Septumhypertrophie (TASH) unterziehen, eignen sich als ein Myokardinfarkt-Modell [69, 133]. In diesem Patientenkollektiv kann daher die Freisetzungskinetik von Biomarkern studiert werden [75-81]. Die Evaluation von cMyBP-C sowie Troponin in diesem Patientenkollektiv wies darauf hin, dass cMyBP-C deutlich vor Troponin freigesetzt wird [8]. Tiefergehende Studien zeigten bemerkenswerterweise, dass cMyBP-C in der Diagnostik eines ACS genauso präzise wie Troponin ist [61]. cMyBP-C hat sich aufgrund dieser Beobachtungen zu einem neuen, vielversprechenden kardialen Biomarker für Patienten mit dem Verdacht auf einen Myokardinfarkt entwickelt [57, 59-61, 92]. Außerdem korreliert die cMyBP-C Konzentration mit der Prognose von Patienten mit Aortenklappenstenosen, da erhöhte cMyBP-C Konzentrationen mit Fibrose und Myokardschäden einhergehen [6, 8, 57-61, 92].

### **1.3 Das N-terminale Fragment des cMyBP-C: C0-C1f**

Im Rahmen einer akuten myokardialen Ischämie sowie der Reperfusion kommt es aufgrund des erhöhten intrazellulären Calcium-Gehaltes zu einer Aktivierung der Proteinase  $\mu$ -Calpain [43]. Ein Substrat dieses Enzyms ist das cMyBP-C [42, 43].

Die Calcium-vermittelte Proteolyse des cMyBP-C führt zur Abspaltung und Freisetzung des C0-C1f. C0-C1f besteht aus der herzspezifischen C0-Domäne, der C1-Domäne sowie

den ersten 17 Aminosäuren der M-Domäne (Abbildung 2) [83]. Insgesamt besteht C0-C1f aus 271 Aminosäuren und ist in etwa 40 kDa schwer [83].

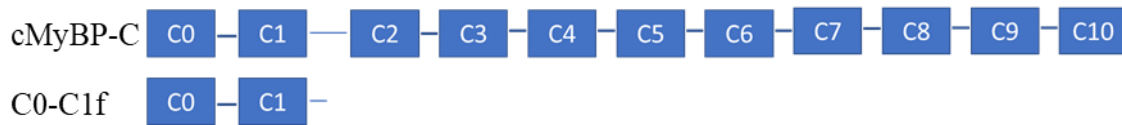


Abbildung 2: Schematische Darstellung von cMyBP-C und dessen N-terminalen Fragment C0-C1f. Durch  $\mu$ -Calpain abhängige Degradation des cMyBP-C kann das N-terminale Fragment C0-C1f im Rahmen einer myokardialen Ischämie freigesetzt werden, modifiziert nach [83].

Da C0-C1f erst durch die aktive Spaltung des cMyBP-C entsteht, wird vermutet, dass die C0-C1f Konzentration im Blutkreislauf nach dem Beginn der myokardialen Ischämie deutlich vor Troponin und cMyBP-C signifikant erhöht sein könnte [42, 87]. Nachteilig ist jedoch, dass die Konzentration des C0-C1f nach dem initialen Peak frühzeitig abnimmt und somit bei Patienten, die mehrere Stunden nach Beginn der Symptome vorstellig werden, möglicherweise ungeeignet ist [87].

#### 1.4 Prognose des akuten Koronarsyndroms

Trotz Interventionsmöglichkeiten wie der PCI ist das Langzeitüberleben der ACS Patienten im Vergleich zu gesunden Menschen eingeschränkt [67]. Die Vermutung, dass eine schnellere und verlässlichere Diagnosestellung mit Hilfe neuer Biomarker die Mortalität eines ACS reduziert, ist naheliegend.

Behandlungsmöglichkeiten des Myokardinfarktes sind neben der (intensiv-) medizinischen Erstversorgung insbesondere die Reperfusionstherapie in Kombination mit einer langfristigen medikamentösen Behandlung der Patienten im Sinne einer Sekundärprophylaxe [52, 125, 135, 143]. Epidemiologische Daten zeigen, dass die intrahospitale Sterblichkeit nach einem Myokardinfarkt in Deutschland bei circa 11 % liegt [33]. Inflammatorische Biomarker wie das Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und C-Reaktive Protein (CRP) sind in diesem Kontext prognostisch relevant [121, 122, 151]. Langfristig ist zudem eine (medikamentöse) Modifikation der Risikofaktoren sowie das Beeinflussen des Remodelings des Herzens essenziell [22, 52, 125]. Ursächlich für die erhöhte Mortalität nach der Akutphase sind unter anderem Sekundärerkrankungen, die durch einen Myokardinfarkt begünstigt werden. Eine typische, jedoch häufig fatale Folge des Myokardinfarktes ist die Herzinsuffizienz aufgrund einer linksventrikulären Dysfunktion [4, 21, 22, 52, 110]. Hierbei ist das Herz unter anderem aufgrund von Fibrose sowie dem

Untergang von Kardiomyozyten nicht mehr in der Lage, das Herzzeitvolumen bei normalen enddiastolischen Ventrikeldrücken zu erbringen [113]. Somit ist die kardiale Fibrose mitverantwortlich für die hohe Mortalität sowie Sekundärerkrankungen nach myokardialer Ischämie [50]. Auch Inflammation spielt bezüglich des kardialen Remodeling nach myokardialer Ischämie eine wesentliche Rolle [12].

Trotz der Tatsache, dass erste klinische Studien die Effizienz einer anti-inflammatorischen Therapie nach myokardialer Ischämie zeigen, sind die zugrunde liegenden Pathomechanismen für die Inflammation und das maladaptive Remodeling noch nicht gänzlich verstanden [2, 3, 121, 122].

### **1.5 Pathophysiologie des Myokardinfarktes**

#### **1.5.1 Grundlegende Pathophysiologie**

Eine der häufigsten Ursachen für einen akuten Myokardinfarkt ist die Ruptur einer instabilen atherosklerotischen Plaque (Typ I Myokardinfarkt) [46]. Einer Plaqueruptur folgt die Freisetzung inflammatorischer Zytokine und Chemokine, wodurch die Migration inflammatorischer Zellen gefördert wird. Konsekutive thromboembolische Auflagerungen können schlussendlich zu einem vollständigen Gefäßverschluss führen [74]. Ein derartiger Gefäßverschluss kann zu einer ausgeprägten Hypoxie und großflächigen Nekrose des distal der Stenose gelegenen Myokards führen [74].

Der Heilungsprozess nach myokardialer Ischämie lässt sich in drei Phasen gliedern (Abbildung 3) [31]. In der initialen inflammatorischen Phase nach myokardialer Ischämie kommt es zur Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren, Chemokinen und Zytokinen (unter anderem C-X-C Motiv Liganden (CXCL), C-C Motiv Chemokin Ligand 2 (CCL-2), synonym „Monocyte chemoattractant protein 1“) [31, 115]. Dies führt zur Migration von Monozyten, Makrophagen und weiterer inflammatorischer Zellen und somit zur Phagozytose des Zelldebris [105]. Zudem kommt es bereits in dieser Phase zur Aktivierung von Fibroblasten, welche zusammen mit den Makrophagen für die Proteolyse und Matrixdegradation mittels Matrix-Metalloproteasen (MMP) zuständig sind [31, 105, 145]. In der darauffolgenden reparativen Phase kommt es zur Proliferation und Transdifferenzierung der Fibroblasten zu (Proto-)Myofibroblasten [31]. Dieser Prozess wird vor allem durch die sinkenden Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine (unter anderem IL-1 $\beta$  und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )) bei gleichzeitig

steigenden Konzentrationen pro-fibrotischer Zytokine (unter anderem *Transforming Growth Factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und IL-10) begünstigt [31]. Zusätzlich zu der hierbei vermehrten intrazellulären Produktion von  $\alpha$  *Smooth Muscle Actin* ( $\alpha$ SMA, kodiert durch das Gen *ACTA2*) kommt es zu Matrixablagerungen und zur Produktion von pro-angiogeneogenetischen Mediatoren [31, 137]. Schlussendlich folgt der Reifungsprozess mit der Bildung von stabilem Kollagen und der endgültigen Narbe [31].

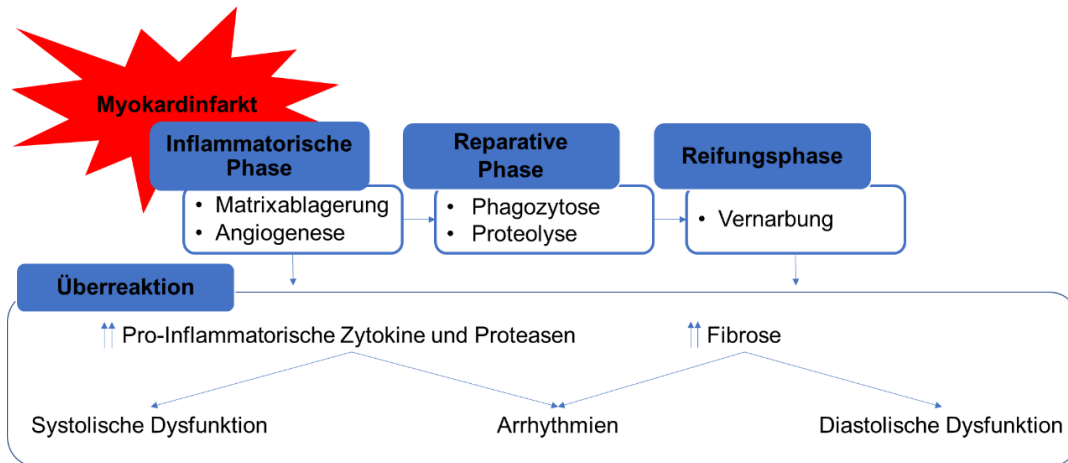


Abbildung 3: Heilungsprozess nach einem Myokardinfarkt. Nach einem Myokardinfarkt werden sukzessiv die inflammatorische Phase, reparative Phase sowie die Reifungsphase durchlaufen. Überlappungen von Phasen sind möglich. Jede dieser Phasen ist durch spezifische Prozesse wie der Angiogeneese, Proteolyse oder Vernarbung charakterisiert. Pathologien während dieser Phasen können zu systolischer bzw. diastolischer Dysfunktion sowie Arrhythmien führen, modifiziert nach [31].

### 1.5.2 Rolle der Fibroblasten nach einem Myokardinfarkt

Die Charakterisierung von Fibroblasten erweist sich als schwierig, da sich Fibroblasten nicht mit Hilfe eines einzelnen Markers definieren lassen [141]. Im Allgemeinen können Fibroblasten jedoch durch die Morphologie in Kombination mit histologischen Markern wie  $\alpha$ SMA und Vimentin charakterisiert und identifiziert werden [141]. Fibroblasten spielen in jeder Phase des Heilungsprozesses eine wichtige Rolle, da sie aufgrund ihrer Fähigkeit, ihren Phänotyp zu verändern, verschiedenste Funktionen wahrnehmen [86, 101]. Sie sind sowohl Produzenten als auch Rezipienten vieler Mediatoren, die im Rahmen der pathophysiologischen Prozesse nach myokardialer Ischämie freigesetzt werden (Abbildung 4).

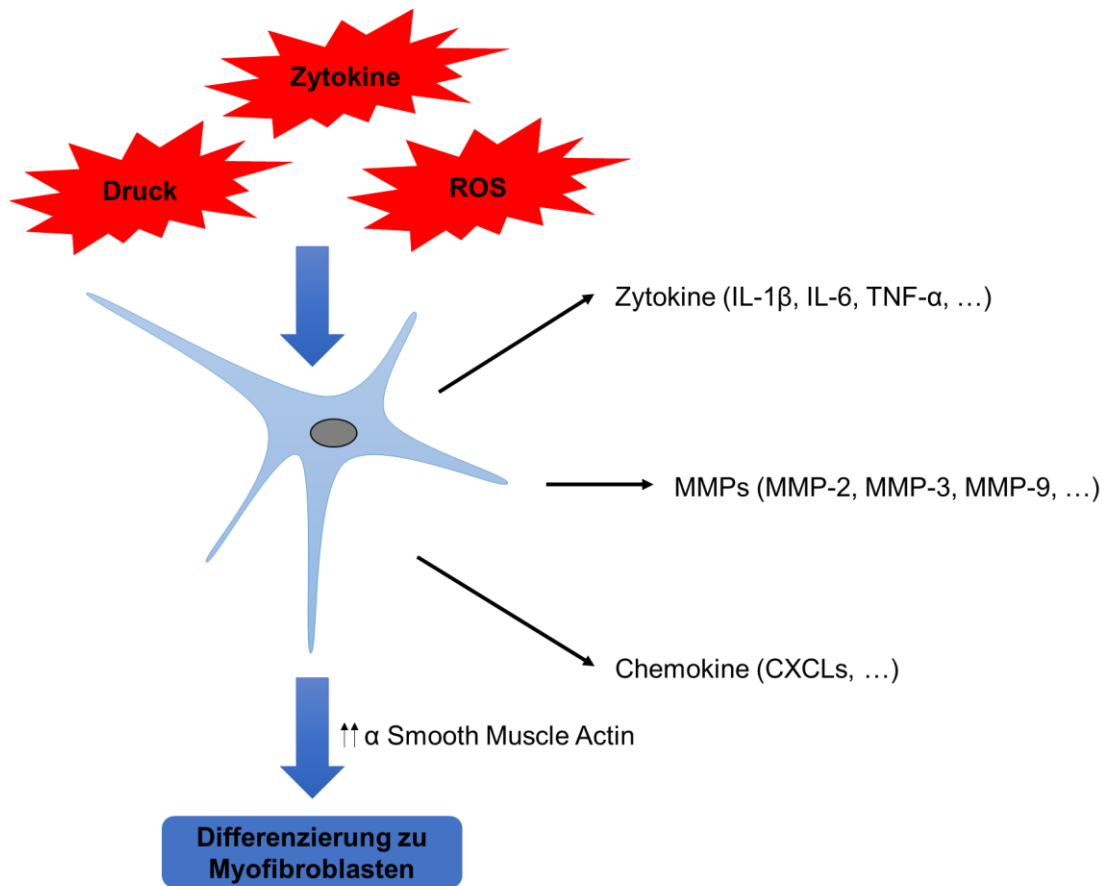


Abbildung 4: Funktion von Fibroblasten im Rahmen einer myokardialen Ischämie. Reaktiv auf erhöhte Drücke, verschiedene Chemo- und Zytokine (unter anderem IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) sowie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) kommt es zur Freisetzung weiterer Zytokine, MMPs und Chemokine. Außerdem kommt es unter anderem durch erhöhte intrazelluläre Produktion von  $\alpha$ SMA zur Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten.

Durch die Nekrose von Kardiomyozyten infolge der myokardialen Ischämie werden *Danger-Associated Molecular Patterns* (DAMPs) freigesetzt, welche durch die Bindung an *Pattern Recognition Rezeptoren* (PRR) das Immunsystem, insbesondere Makrophagen, aber auch Fibroblasten aktivieren (Abbildung 5) [115]. Dies induziert initial eine sterile Inflammation und anschließend das Remodeling der extrazellulären Matrix sowie die Fibrosierung des Infarktareals [115]. Beispiele für DAMPs sind Interleukin 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) oder *High-Mobility-Group Protein B1* (HMGB1) [115]. Die Weiterleitung der Signale erfolgt insbesondere über *Toll-like* Rezeptoren (TLR), *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* (RAGE) und Interleukin Rezeptoren [115, 126]. Diese Aktivierung wiederum führt zur Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine (unter anderem IL-1 $\beta$ ), MMPs sowie weiterer Mediatoren wie dem TGF- $\beta$  durch M2 Makrophagen und (Myo-)Fibroblasten [31, 115]. IL-1 $\beta$  sowie Chemokine fördern die Migration von Immunzellen und die Freisetzung weiterer pro-inflammatorischer Zytokine wie dem IL-6 [31, 134]. Außerdem inhibiert IL-1 $\beta$  im Rahmen der inflammatorischen Phase eine verfrühte Fibrosierung des Infarktareals [100]. Der Einfluss von DAMPs auf weitere Zelltypen ist in Abbildung 5 dargestellt.

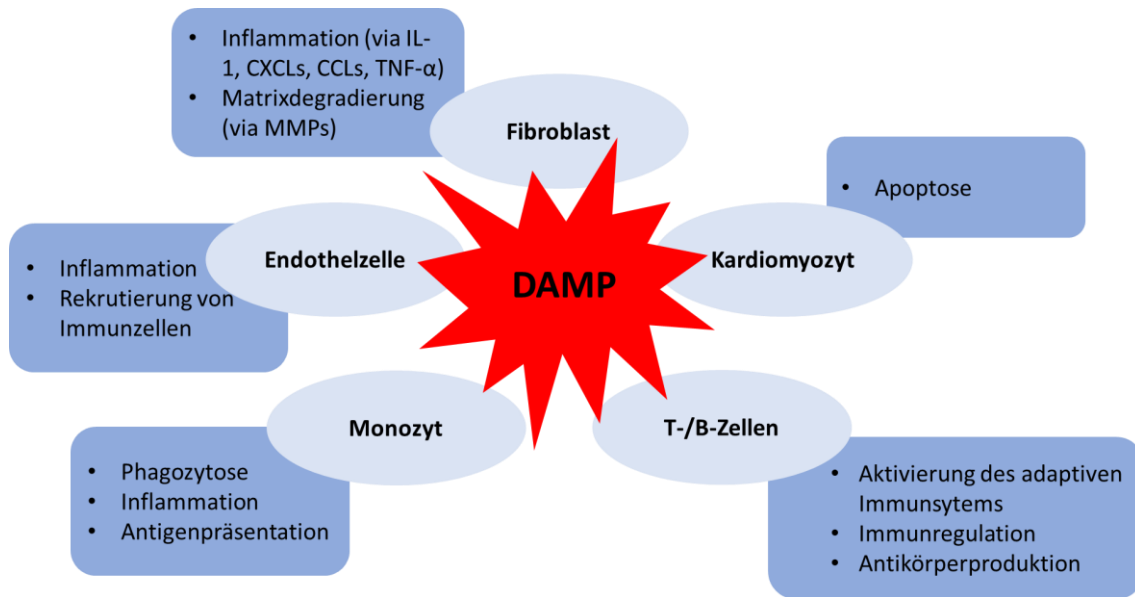


Abbildung 5: Einfluss von DAMPs auf Fibroblasten und weitere Zelltypen. DAMPs haben unter anderem einen Einfluss auf Immunzellen (Monozyten/Makrophagen, T-/B-Zellen), Kardiomyozyten, Endothelzellen und Fibroblasten, modifiziert nach [36].

Das im Rahmen einer myokardialen Ischämie freigesetzte TGF- $\beta$  induziert die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, wodurch vermehrt intrazelluläres  $\alpha$ SMA sowie Kollagen synthetisiert wird [11, 31]. Die Überleitung in die fibrotische Heilungsphase wird ebenfalls durch TGF- $\beta$  initiiert, da inflammatorische Zellen durch TGF- $\beta$  inhibiert werden [17]. Als zentraler Modulator hat TGF- $\beta$  auch Einfluss auf weitere Zelltypen (unter anderem Endothelzellen, Makrophagen) sowie die Phasen des Heilungsprozesses nach einem Myokardinfarkt [17]. Auch bei der Entstehung von Arrhythmien nach einem Myokardinfarkt sind Fibroblasten beteiligt, da durch die Fibrosierung akzessorische Leitungsbahnen und somit das Potential für kreisförmige Erregungen geschaffen werden. Folglich werden *Myofibroblasten-Myozyten Coupling* Arrhythmien begünstigt [31]. Problematisch sind zudem Fibrosierungen außerhalb des betroffenen nekrotischen Gewebes, da hierdurch vitales Myokard irreversibel geschädigt werden kann [31].

Kardiale Fibroblasten nehmen somit zu jedem Zeitpunkt des Infarktes eine wichtige Rolle ein. Damit sind Fibroblasten ein sehr nützliches therapeutisches Ziel [132]. Mittels Angiotensinkonversionsenzym-Hemmer (ACE-Hemmer) und Angiotensin Rezeptor Blocker konnte bereits der positive Effekt einer Fibroblasten-Modulierung bewiesen werden, jedoch werden weitere Interventionsmöglichkeiten dringend benötigt [5, 29]. Diesbezüglich sind die zugrundeliegenden Signalwege von besonderer Relevanz. Für die

pro-fibrotische Aktivierung von Fibroblasten und deren Differenzierung zu Myofibroblasten ist der TGF- $\beta$  Signalweg über die Aktivierung verschiedener SMAD Proteine relevant [47]. Bezüglich inflammatorischer Signalwege sind die bereits zuvor erwähnten TLR, IL-1R sowie RAGE in Fibroblasten von Bedeutung (Abbildung 6) [15, 25, 106].

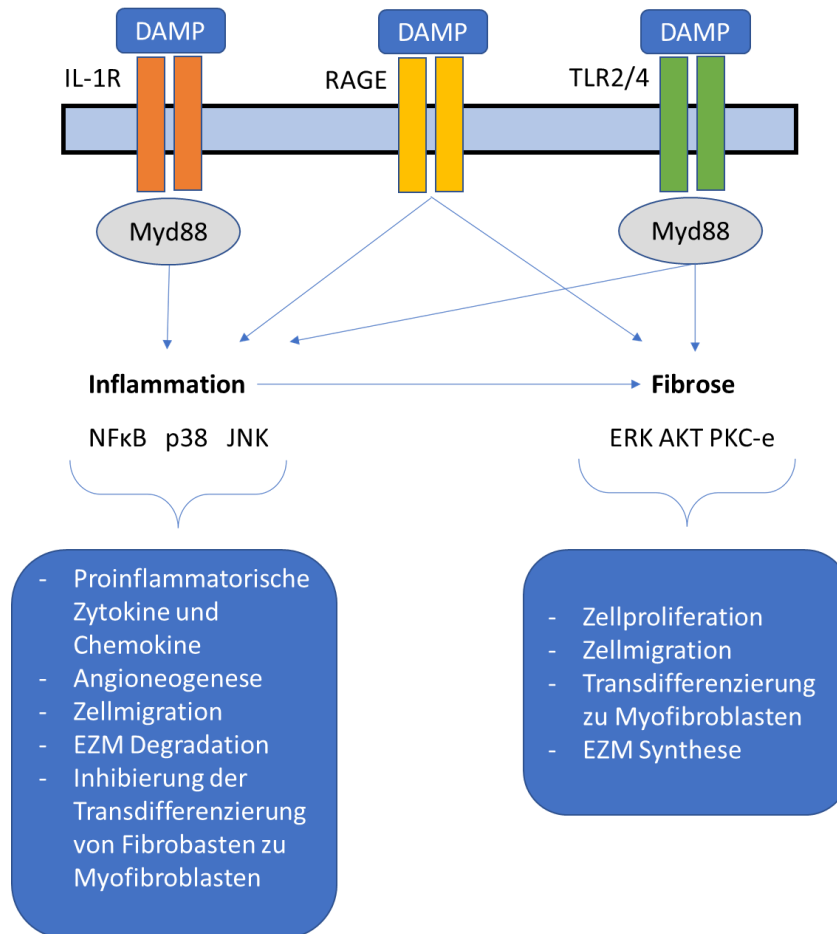


Abbildung 6: Schematische Zusammenfassung der inflammatorischen Signalwege in Fibroblasten. Diese werden vor allem via IL-1R, RAGE sowie TLR2/4 vermittelt. Die Aktivierung von TLR induziert über MAP-Kinasen, Januskinasen, p38 sowie ERK die Transkription von pro-inflammatorischen Zytokinen (unter anderem IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) und Wachstumshormonen (unter anderem TGF- $\beta$ , FGF). Die Proliferation von Fibroblasten und die Kollagen-Synthese können ebenfalls über TLR induziert werden, modifiziert nach [146].

Hierbei wird durch das Binden von Proteinen an die TLR2/4, RAGE sowie IL-1 Rezeptoren der MAP-Kinase Signalweg mit Phosphorylierung von ERK, NFκB sowie PI3K-AKT aktiviert (Abbildung 6) [15]. Dies führt unter anderem zur Erhöhung der Transkription pro-inflammatorischer Chemokine und Zytokine (unter anderem IL-1 $\beta$ , CXCL-2, TNF- $\alpha$ ) [15, 25, 106]. Außerdem werden durch die inflammatorischen Signale die Angiogenese, Zellmigration sowie Degradation der extrazellulären Matrix (EZM)

induziert [146]. Einerseits wird durch diese inflammatorische Kaskade die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten inhibiert [146]. Andererseits ist jedoch auch die Aktivierung der fibrotischen Signalwege durch TLR möglich, so dass die EZM Synthese sowie die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten verstärkt werden kann (Abbildung 6) [146].

In der CANTOS-Studie wurde die Rolle einer anti-inflammatorischen Therapie nach myokardialer Ischämie überprüft [2, 121, 122]. Erstmals konnte bewiesen werden, dass die Inhibition der Inflammation (IL-1 $\beta$  Signalweg) zu einer signifikanten Reduzierung der kardiovaskulären Ereignisse nach myokardialer Ischämie führt [121]. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass hohe CRP Konzentrationen mit der Inzidenz schwerer kardiovaskulärer Ereignisse korrelieren [122]. Dies bekräftigt die Hypothese des enormen Nutzens einer Inhibition der Inflammation nach einem Myokardinfarkt [122]. Eine globale Inhibition des IL-1 $\beta$  Signalweges ist jedoch mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden. Daher ist die Erforschung der Ursachen für die Entstehung der Inflammation essenziell, um zukünftig bessere und insbesondere spezifischere Methoden zur gezielten Hemmung der Inflammation nach myokardialer Ischämie zu gewährleisten. Da Fibroblasten einen Teil der inflammatorischen Chemo- sowie Zytokine freisetzen und die Inflammation regulieren können, sind diese ein potenzielles therapeutisches Ziel.

### **1.6 Pathophysiologische Relevanz des C0-C1f**

Durch detaillierte Untersuchungen des Einflusses von cMyBP-C sowie dessen Fragmente auf Monozyten und Makrophagen konnte durch unsere Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass C0-C1f zu der Initiierung der Inflammation und Freisetzung spezifischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder IL-6 führt [83]. Andere Fragmente wie C0-C2 oder C0-L sowie Troponin führten interessanterweise zu keiner Aktivierung von Makrophagen [83]. Unter Verwendung verschiedener Inhibitoren konnten die zugrundeliegenden Signalwege und die für die C0-C1f bedingte Aktivierung relevanten Rezeptoren eruiert werden [83]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass C0-C1f das cMyBP-C im Sarkomer ersetzen kann und somit zu einer Veränderung der physiologischen Funktion führt [154]. Dies kann unter anderem mit einer Herzinsuffizienz einhergehen [154]. C0-C1f beeinflusst somit die Funktion von Kardiomyozyten [154]. In der Arbeitsgruppe um J. Robbins wurde ein transgener Mausstamm gezüchtet, welcher C0-C1f überexprimiert [118]. In diesem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine permanent erhöhte C0-C1f Konzentration



nach mehreren Wochen zu kardialer Fibrose, Herzinsuffizienz und schließlich zum verfrühten Tod der Tiere führte [118].

Es wurde jedoch bis heute nicht bewiesen, ob C0-C1f einen direkten Einfluss auf Fibroblasten und ihre Differenzierung zu Myofibroblasten hat [44, 154]. Auch ist bis heute unklar, welche Pathomechanismen und Signalwege in Fibroblasten nach Stimulation mit C0-C1f aktiviert werden. Zudem ist C0-C1f nach einer myokardialen Ischämie im Rahmen eines ACS nur kurzfristig im Blut vorhanden, so dass vielmehr die direkten Effekte auf kardiale Fibroblasten von Interesse und Relevanz sind [87]. Da die heutigen Therapieoptionen zur Behandlung und Prävention der sekundären Komplikationen nach Überleben eines Myokardinfarktes, wie der Herzinsuffizienz oder maligne persistierende Herzrhythmusstörungen durch die Entstehung von Fibrose/Narben und überschießende Inflammation, nicht ausreichend sind, ist die Erforschung der zugrundeliegenden Pathomechanismen wesentlich. Auch erfolgte noch keine Evaluierung der C0-C1f Konzentration im Menschen, da bis dato keine Nachweismethode für C0-C1f existiert, obwohl dieses Peptid die oben erläuterten pathologischen Funktionen aufweist.

Daher steht eine Untersuchung des Wirkmechanismus von C0-C1f unmittelbar nach einem Myokardinfarkt und die Evaluierung der daraus entstehenden therapeutischen Möglichkeiten aus.

### **1.7 Ziel dieser Arbeit**

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer Detektionsmethode für das cMyBP-C und dessen N-terminalen Fragment C0-C1f, um künftig den Wert von C0-C1f als neuen kardialen Biomarker zu evaluieren. Zudem soll der Einfluss von C0-C1f auf Fibroblasten untersucht werden, um die pathologischen Mechanismen zu verstehen und die Entwicklung neuer Therapieoptionen zu ermöglichen. Hierfür werden folgende Fragestellungen untersucht:

- (i) Wird C0-C1f nach myokardialer Ischämie freigesetzt?
- (ii) Führt C0-C1f zu der Aktivierung von Fibroblasten?
- (iii) Welche Signalwege sind bei der durch C0-C1f induzierten Aktivierung von Fibroblasten beteiligt?

Das Verständnis der durch C0-C1f induzierten Effekte und die Identifizierung der zugrundeliegenden Signalkaskaden stehen im Fokus dieser Arbeit. Somit soll eine gezielte Modifikation der durch C0-C1f induzierten Effekte mittels konventioneller Inhibitoren ermöglicht werden.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### Versuchstiere

<u>Name</u>	<u>Vertreiber</u>
Männliche Wistar Ratten (RjHan:Wi)	Janvier Labs, Frankreich
C57BL/6 Mäuse	Charles River Laboratories

Tabelle 1: Verwendete Versuchstiere.

#### Zellkultur

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Humane Fibroblasten (huFib)	InSCREENeX GmbH
Serumhaltiges huFib Medium	InSCREENex GmbH
Serumfreies huFib Medium	InSCREENex GmbH
Coating Kollagenlösung	InSCREENex GmbH

Tabelle 2: Verwendete Materialien in der Zellkultur.

#### Allgemeiner Laborbedarf

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Zellkulturschalen, verschiedene Größen	Cellstar, Greiner Bio-One, Nunclon Surface
Cell Strainer	Falcon Corning
Glas Pipetten	Greiner Bio-One
Falcon Röhrchen	Corning Science
Mini-Protean Stain-Free Gele	Bio-Rad Laboratories

Multiplate PCR Platten, 96 Wells, clear	Bio-Rad Laboratories
Nunc 96-Well MaxiSorp Black Microwell Platten	Thermo Scientific
Pipetten	Gilson Inc
Pipettenspitzen	Nerbe plus GmbH & Co. KG
16-Tube SureBeads™ Magnetic Rack	Bio-Rad Laboratories
Zellschaber	Falcon Becton Deckinson
Neubauer Zählkammer	Marienfeld & Assistent

Tabelle 3: Materialien für den allgemeinen Laborbedarf.

**Geräte**

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
HeraCell Brutschrank (5 % CO <sub>2</sub> )	Heraeus
Fluoreszenz Mikroskop (BZ-9000)	Biorevo
Zentrifuge, Rotina 420R	Hettich Zentrifugen
Inkubator	HERA Cell
Zentrifuge, Centrifuge 5417R	Eppendorf
Langedorff-Apparatur	
Lichtmikroskop	Leica DMIL Microsystems
Magnetrührer	IKA Labortechnik
Mini Plate Spinner	Labnet
Quanterix SR-X	Quanterix Corporation
Real-Time CFX96	Bio-Rad Laboratories

Heidolph Titramax 100	Heidolph Instruments
Heidolph Polymas 2040	Heidolph Instruments
Spektrophotometer	NanoDrop PeqLab
Thermoblock, Thermomixer comofort	Eppendorf
Thermocycler	Biometra T Gradient Thermoblock
McIlwain Tissue Chopper	The Mickle Laboratory Engeneering
Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories
Vortexer	IKA Labortechnik
Waage	Sartorius
Wasserbad, Lauda 006T	Julabo Labortechnik
Bio-Rad ChemiDoc MP	Bio-Rad Laboratories
Zellkultur Bench Hera safe	Heraceus

Tabelle 4: Verwendete Geräte.

### Chemikalien

<u>Chemikalie</u>	<u>Hersteller</u>
1x Dulbeccos Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (DPBS, ohne Calcium, ohne Magnesium)	PAN Biotech
Aprotinin	Fluka
BSA-Albumin Fraktion V	Roth
Chloroform	Fluka
Kollagenase	Worthington Biochemical Corporation
DAPI, Dyhydrochloride	Calbiochem

## 2. Materialien und Methoden

ddH <sub>2</sub> O	Braun
DTT	Sigma
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 1x, 4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamine, 110 mg/L Sodium Pyruvate)	Gibco
EDTA	Sigma
Fetales Kälberserum, FBS Ultra Low Endotoxin	Biowest
Glycerol >99 %	Sigma
Hepes	Sigma
Leupeptin	Sigma
Magnetic Beads Protein G	Bio-Rad Laboratories
Milchpulver	Roth
Mowiol	Fluka
Natriumchlorid >99,5 %	Roth
Normal Goat Serum 10 %	7ymed
Penicillin/Streptomycin (5000 Einheiten/mL Penicillin, 5000 µg/mL Streptomycin)	Gibco
Paraformaldehyd	Roth
Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Scientific
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific
PMSF	Sigma

Protein Assay Standard II	Bio-Rad Laboratories
Protein Marker IV	PeqLab
Qiazol Lysis Reagent	Qiagen
RC DC Protein Assay Reagent A/B/S	Bio-Rad Laboratories
Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories
Sso Fast Eva Green Supermix	Bio-Rad Laboratories
Tris Puffer >99,9 %	Roth
Trypan-Blue Solution (0,4 %)	Sigma
Trypsin	Gibco
Tween-20	Sigma
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien.

### Kits und Assays

<u>Kit/Assay</u>	<u>Hersteller</u>
Bradford Assay	Bio-Rad Laboratories
iScript <sup>TM</sup> cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories
cMyBP-C ELISA Kit	Elabscience
RNeasy Mini Kit (50)	Qiagen
Simoa <sup>TM</sup> Mouse TNF- $\alpha$ Discovery Kit	Quanterix Corporation

Tabelle 6: Verwendete Kits und Assays.

**Puffer**

<u>Puffer</u>	<u>Hersteller / Zusammensetzung</u>
10x Tris/Glycine/SDS Buffer	Bio-Rad Laboratories
2x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad Laboratories
WCE Puffer Plus	1 mL WCE Puffer, 10 µL 100 mM DTT, 5 µL Leupeptin, 10 µL Aprotinin, 5 µL PMSF
Laufpuffer	100 mL 10x Tris/Glycine/SDS Buffer, 900 mL ddH <sub>2</sub> O
Waschpuffer	5 L ddH <sub>2</sub> O, 500 mL 1x PBS, 5 mL Tween-20
Stripping Puffer	10 mL 1 M Glycerin, 90 mL ddH <sub>2</sub> O, 1 mL HCl
Blocking Puffer	12 mL Magermilchpulver, 200 mL Waschpuffer
10x TBS Puffer (Immunhistochemie)	5 L ddH <sub>2</sub> O, 121 g Tris Pufferan, 400 g NaCl
Sekundär Antikörperlösung (Immunhistochemie)	Alex Fluor Goat Anti-Rabbit 1:200 in Antikörper Diluent, 1 % Goat Serum
Powell Medium	110 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,2 mM MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O, 25 mM HEPES, 10 mM Glucose-Monohydrat D+
RPE Puffer	Qiagen
RWT Puffer	Qiagen
Ladepuffer I Western Blot	20 mL 1M Tris pH 6,8, 80 mL 10 % SDS, 0,4g Bromphenolblau, 40 mL Glycerin



Ladepuffer 2 Western Blot	200 µL Ladepuffer I, 50 µL 1 M DTT
Blocking Puffer (Immunhistochemie)	10 mL Goat Serum, 0,5 g Albumin Fraktion V (FBS)
WCE Puffer	1 M Hepes, 5 M NaCl, 1 M Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 0,25 % Glycerin, 0,5 M EDTA
Mowiol (Immunhistochemie)	12 g Glycerol, 4,8 g Mowiol, 12 mL ddH <sub>2</sub> O, 24 mL Tris Puffer 0,2 M

Tabelle 7: Verwendete Puffer und deren Zusammensetzung.

## Software

<u>Software</u>	<u>Hersteller</u>
ND-100 V3.81	ThermoFisher Scientific
R Version 4.0.3	The R Foundation
SPSS Version 26	IBM
GraphPad Version 7	GraphPad
ImageLab	Bio-Rad Laboratories
ImageJ	Open Source
Microsoft Office 2016	Microsoft
Endnote X9.2	Clarivate Analytics

Tabelle 8: Verwendete Software.

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Ethische Grundsätze

Tiertötungen zu wissenschaftlichen Zwecken gemäß §4 Abs. 4 TSchG waren durch den Tierschutzbeauftragten der Justus-Liebig-Universität Gießen genehmigt (Registration No.: 588\_M und 589\_M). Diese entsprachen den zu dem Zeitpunkt geltenden ethischen Anforderungen in vollem Umfang. Die Haltung der Versuchstiere entsprach den entsprechenden Anforderungen und wurde durch die örtlichen Behörden genehmigt (Az: FD62-§11JLUHumPhys). Alle Experimente, in denen humane Blutproben verwendet wurden, sind von der Ethik-Kommission der Justus-Liebig-Universität Gießen genehmigt (Az: 145/11) und entsprachen der geltenden Fassung der Deklaration von Helsinki.

#### 2.2.2 Produktion der N-terminalen Fragmente des cMyBP-C

Die rekombinanten Fragmente des cMyBP-C (mC0-L, mC0-C1, mC0-C1f, mC0-C2 und hC0-C1f) wurden, wie zuvor von Lipps et al. beschrieben, mittels pET Expressionssystem generiert und freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Professor Dr. Sadayappan bereitgestellt [44, 83]. Zudem wurde Endotoxin-freies C0-C1f mit Hilfe der *ClearColi* Expressionstechnologie nach Herstellerangaben produziert [91].

#### 2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Nano-Drop

Konzentrationen von Proteinen wurden mit Hilfe des Nano-Drop 1000 quantifiziert. Zunächst wurde zur Relativierung eine Blank-Messung mit PBS durchgeführt. Da Puffer die Absorption der UV-Strahlung beeinflussen können, wurde sichergestellt, dass der verwendete Puffer für die Proteinmessung (A280-Methode) geeignet ist und dem „Protein solvent“ entsprach. Anschließend konnte die Probe mit dem Protein geladen werden. Nach der Messung der Extinktion bei 280 nm kann mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes die Proteinkonzentration bestimmt werden.

#### 2.2.4 Proteinanalysen mittels Western Blots

Proteine von Gewebeproben wurden durch Lysieren der Zellen mittels WCE Puffer und Proteinase-Inhibitoren nach Zerkleinern durch Mörsern mit flüssigem Stickstoff extrahiert [83]. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde 10 % NP40 hinzugefügt, die Zellsuspension gevortext und mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurde die Zellsuspension für zehn Minuten zentrifugiert, so dass der zellfreie Überstand für weitere

## 2. Materialien und Methoden

Analysen verwendet werden konnte. Die Proteinkonzentration wurde quantifiziert (Bradford Assay). Proteine (20 – 30 µg) wurden mittels SDS-PAGE Elektrophorese aufgetrennt und via Western Blotting mit spezifischen Antikörpern analysiert [18]. Hierfür wurden die Proben 1:1 mit 2x Laemmli Puffer gemischt und für fünf Minuten bei 95°C gekocht. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gelegt. Nach dem Laden der Proben in die Geltaschen wurde die Elektrophorese für 90 Minuten bei 80 Volt gestartet. Anschließend wurden die Proteine auf die Membran geblottet. Hierfür wurde das siebenminütige Turboblot Programm genutzt. Die Membran wurde mit Milch (5 % *non-fat milk*) für 90 Minuten geblockt und über Nacht mit dem primären Antikörper bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal (je 15 Minuten) mit dem Waschpuffer gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde eine Stunde auf die Membran gegeben und anschließend durch dreimaliges Waschen entfernt. ECL bzw. ECL Plus und das ChemiDoc MP Imaging System wurden zur Detektion verwendet.

Folgende Antikörper wurden für Western Blots verwendet:

<u>Antikörper</u>	<u>Katalognummer</u>	<u>Hersteller</u>
Donkey Anti-Goat IgG HRP	Sc-2020	Santa Cruz
Goat Anti-Rabbit IgG HRP	Sc-2004	Santa Cruz
Goat Anti-Mouse IgG HRP	Sc-2005	Santa Cruz
αSMA (human)	19245 ab124964	Cell Signaling Abcam
COL1 (murin)	600-401-103-0.1	Rockland
COL1 (human)	T40777R	Rockland
ERK (human)	4695	Cell Signaling
pERK (human)	4377	Cell Signaling
SMAD3 (human)	9523	Cell Signaling
pSMAD3 (human)	9520	Cell Signaling

GAPDH (murin und human)	3683 sc25778	Cell Signaling Santa Cruz
MYBPC3 E7	Sc-137180	Santa Cruz
MYBPC3 I1	LS-C323179	LS-Bio
MYBPC3 H8	Eigene Herstellung in Kooperation mit ProSci	

Tabelle 9: Verwendete Antikörper für Western Blots.

### 2.2.5 Immunhistochemische Färbungen

Zwecks immunhistochemischer Färbungen (IF) wurden Zellen auf 12-Well Platten mit Deckgläsern (12 mm) ausplattiert. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und durch zehnmünütige Inkubation mit 1:1 Aceton/Methanol fixiert. Nach dreifachem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Hilfe von 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert (15 Minuten). Nach Absaugen des Tritons wurden die Zellen erneut dreifach mit PBS gewaschen. Nach einstündiger Inkubation mit Serum (Goat Serum sowie 1 % BSA in PBS) und 0,1 % Triton X-100 wurden die Zellen über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper in adäquater Verdünnung (1:500) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper in adäquater Konzentration (1:200 verdünnt in PBS mit NaN<sub>3</sub>) im Dunkeln für eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 1 µg/mL Mowiol und DAPI (1:1000) eingebettet, über Nacht getrocknet und anschließend detektiert.

Folgende Antikörper wurden für die IF verwendet:

<u>Antikörper</u>	<u>Katalognummer</u>	<u>Hersteller</u>
Alexa Fluor Goat Anti-Mouse	ab150113	Abcam
MYBPC3 E7	Sc-137180	Santa Cruz
MYBPC H8	Eigene Herstellung in Kooperation mit ProSci	
$\alpha$ SMA	C6198	Sigma-Aldrich
Vimentin	ab92547	Abcam
DAPI	249-186-7	Roth

*Tabelle 10: Verwendete Antikörper für immunhistochemische Färbungen.*

### 2.2.6 Depletion von cMyBP-C mittels magnetischer Beads

Ein Antikörper, welcher spezifisch für die intermediäre Region des cMyBP-C (I1, bindet die M-Domäne) ist, wurde an magnetische Beads konjugiert. Durch die intermediäre Bindungsstelle werden Fragmente, die länger als C0-C1f sind, gebunden, wohingegen C0-C1f selbst nicht gebunden wird (Abbildung 7). Dadurch wird erreicht, dass der Überstand nach Depletion nur noch C0-C1f und N-terminale Fragmente, die kürzer als C0-C1f sind, enthält. Da physiologisch keine N-terminalen Fragmente kürzer als C0-C1f vorkommen, enthält die Probe somit nur noch C0-C1f.

Hierfür wurden die magnetischen Beads zunächst resuspendiert. 100  $\mu$ L der Beads wurden dann in 1,5 mL Tubes überführt. Die Beads wurden mit Hilfe eines magnetischen Tube-Halters magnetisiert und der Überstand entfernt. Daraufhin wurden die Beads mit 1000  $\mu$ L PBS-T (PBS/0,1 % Tween-20) gewaschen. Hierfür wurden die Beads in der Waschlösung resuspendiert, magnetisiert und der Überstand entfernt. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Daraufhin wurden 5  $\mu$ g Antikörper in PBS-T verdünnt und hinzugefügt. Nach sanftem Resuspendieren wurden die Tubes für zehn Minuten bei Raumtemperatur in einem Rotator inkubiert. Anschließend wurden die Beads erneut gewaschen. Nach Hinzufügen der in PBS/T verdünnten Probe (100 – 500  $\mu$ L) wurde die Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Rotator inkubiert.

Nach Magnetisieren der Beads wurde je 100  $\mu$ L des Überstandes für ein Well auf die ELISA-Platte überführt.

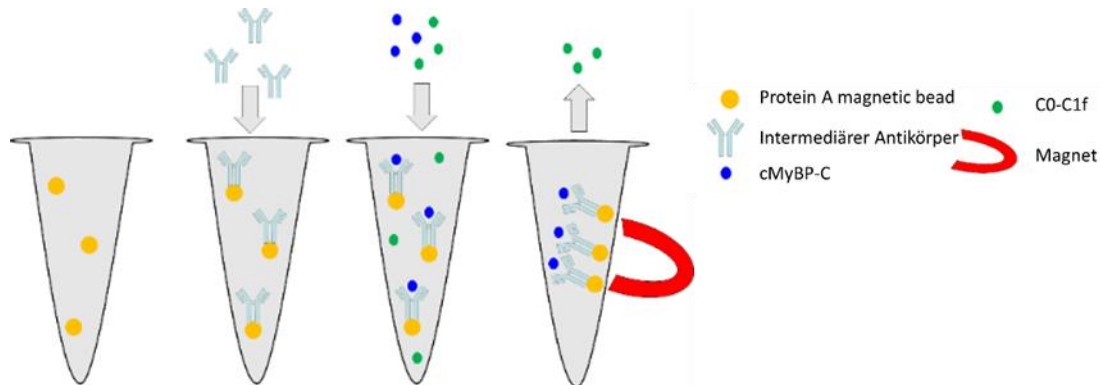


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Depletion von cMyBP-C Fragmenten länger als C0-C1f mit Hilfe an magnetische Beads gekoppelter Antikörper. Zunächst wurde hierfür der Antikörper, der die intermediäre Region des cMyBP-C bindet, an magnetische Beads gekoppelt. Nach Waschen wurde die Probe, die sowohl C0-C1f als auch cMyBP-C enthält, hinzugegeben. Nach Inkubation wurden die Beads fixiert. Der Überstand enthielt das C0-C1f, wohingegen alle Fragmente, die länger sind, an die Beads gebunden blieben.

Zur Quantifizierung der cMyBP-C sowie C0-C1f Konzentration in Serumproben wurde das Elabscience cMyBP-C ELISA Kit nach Herstellerangaben verwendet.

### 2.2.7 Isolation, Kultivierung und Stimulation von murinen Kardiomyozyten und Fibroblasten

Es wurden sechs bis acht Wochen alte C57BL/6 Mäuse bzw. Wistar Ratten mittels CO<sub>2</sub> oder Isofluran narkotisiert und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Das Herz wurde entnommen und in Powell-Medium gewaschen.

#### Kardiomyozyten Isolation

Kardiomyozyten wurden nach der 1980 von Powell beschriebenen Methode von narkotisierten männlichen Wistar Ratten isoliert [114]. Die entnommenen Herzen wurden an die Kanüle des Langendorff Perfusionssystems angehängen. Daraufhin wurden die Herzen nach Perfusion mit Powell-Puffer durch Kollagenasen verdaut. Nach Zerkleinern der Herzen mit Hilfe des Tissue Choppers wurden die Kardiomyozyten gewaschen, indem die Zellsuspension vorsichtig pipettiert wurde. Nach Zentrifugation für eine Minute bei 25x g wurden die Zellen im Pellet in Medium 199 (Biochrom) mit HEPES, 5 mM Kreatin, 2 mM Carnitin, 5 mM Taurin und 10  $\mu$ M Cyotsine-arabinoruranoside (pH 7,4) resuspendiert und ausplattiert.

### **Fibroblasten Isolation**

#### *Langendorff-Methode*

Die zuvor beschriebene Methode zur Isolation von Kardiomyozyten wurde analog mit murinen Herzen durchgeführt [114]. Nach Zentrifugation bei 25x g für eine Minute wurde der Überstand, welcher Fibroblasten und Endothelzellen enthält, in ein 2 mL Tube überführt und bei 250x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet im Medium (DMEM mit 25 mM HEPES sowie 1 % Penicillin/Streptomycin) resuspendiert [45]. Nach Isolation wurden die Zellen auf 60 mm Kulturschalen mit 6 mL DMEM mit 20 % FBS ausplattiert. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium gewechselt. Inkubiert wurde bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Zellen wurden kultiviert, bis eine Konfluenz von 80 bis 90 % erreicht wurde.

#### *Verdau-Methode*

Nach dem Entnehmen der murinen Herzen wurden die Herzen manuell zerkleinert. Durch Waschen mit Powell-Medium wurde restliches Blut aus den Herzen entfernt. Daraufhin wurden die Gewebstückchen in einem 50 mL Erlenmeyerkolben mit 20 mL Verdaulösung (25 mg Kollagenase, 5 mg Trypsin) für eine Stunde bei 37°C auf einem Orbitalshaker inkubiert. Alle 20 Minuten wurde die Suspension mit einer 25 mL Pipette vorsichtig gemischt. Nach einer Stunde wurde die Suspension durch eine 100 µm Membran gefiltert. Das Filtrat wurde auf Eis gelegt, während die Herzstückchen erneut in einer frischen Verdaulösung analog zum vorherigen Prozess inkubiert wurden. Nach erneuter Zentrifugation und Filtration wurde die Zellsuspension ebenfalls auf Eis gelegt, während die Herzstückchen ein drittes Mal in einer frischen Verdau-Lösung inkubiert wurden. Nach anschließender Zentrifugation und Filtern wurden die drei Zellsuspensionen gepoolt und bei 10000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt bzw. zwecks Charakterisierung im Rahmen des Etablierungsprozesses gesondert ausplattiert. Das Zell-Pellet wurde in Medium resuspendiert. Nach Isolation wurden die Zellen auf 60 mm Kulturschalen mit 6 mL DMEM und 10 % FBS ausplattiert. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium gewechselt. Inkubiert wurde bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Zellen wurden kultiviert, bis eine Konfluenz von 80 – 90 % erreicht wurde.

### *Gewebsstückchen-Methode*

Die von Schafer et al. etablierte Methodik zur Isolation von Fibroblasten via Ausplattieren von zerkleinerten Herzstückchen wurde analog verwendet [128]. Hierfür wurden die Maus Herzen nach Entnahme in circa 1 – 2 mm<sup>3</sup> große Stücke geschnitten, so dass eine möglichst große Oberfläche entsteht. Diese Herzstückchen wurden dann auf 60 mm Schalen in DMEM mit 20 % FBS bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> ausplattiert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Die angewachsenen Fibroblasten wurden kultiviert, bis eine Konfluenz von 80 – 90 % erreicht wurde und daraufhin passagiert.

### *Stimulation der Fibroblasten*

Abhängig von der Isolationsmethode wurden die Zellen in verschiedenen Passagen stimuliert. Fibroblasten, die mit der Verdau-Methode und Langendorff-Perfusion isoliert wurden, wurden in Passage 1 verwendet. Fibroblasten, die nach der Gewebstückchen-Methode isoliert wurden, konnten bis Passage 5 kultiviert werden. Beim Splitten der Zellen auf 6-Well Platten (pro Well 100.000 – 125.000 Zellen) wurde auf ein Medium mit 2 % FBS gewechselt. 24 Stunden nach dem Splitten wurde das Medium gegen ein FBS-freies Medium mit den Stimulantien in entsprechender Konzentration (500 ng/mL mC0-C1f, 500 ng/mL C0-Linker, 1 µg/mL Lipopolysaccharid (LPS) oder 10 ng/mL TGF-β bzw. Kombinationen der Stimulantien) ausgetauscht. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt, wobei je 1 mL des Mediums für weitere Analysen in 1,5 mL Eppendorf Tubes überführt und bei -80°C eingefroren wurde. Anschließend wurden die Zellen mit 4°C kaltem 1x PBS gewaschen und ebenfalls bei -80°C eingefroren.

### **2.2.8 Kultivierung und Stimulation humaner Fibroblasten**

Humane Fibroblasten (huFib) wurden in FCS-haltigem Medium kultiviert. Die huFib wurden analog zu den murinen Fibroblasten stimuliert. Hierfür wurden die Zellen auf Kollagen-beschichteten 6-Well Platten unter Verwendung von serumfreiem Medium gesplittet und stimuliert. Anstelle des murinen C0-C1f wurde humanes C0-C1f (hC0-C1f) verwendet.

Hierbei wurde das physiologisch nicht vorkommende C0-Linker (C0-L), ein weiteres N-terminales Fragment des cMyBP-C, als Kontrollpeptid verwendet (Abbildung 8).



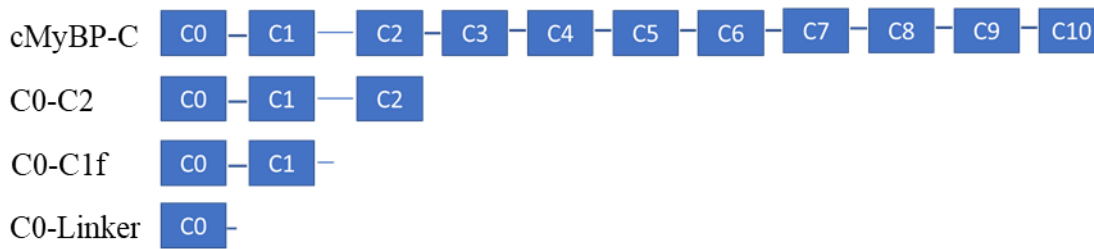


Abbildung 8: Schematische Darstellung von cMyBP-C und dessen N-terminalen Fragmente. C0-C2 sowie C0-Linker (C0-L) werden im Rahmen einer myokardialen Ischämie nicht freigesetzt, modifiziert nach [83].

### 2.2.9 Inhibition verschiedener Signalwege in humanen Fibroblasten

Für die Inhibitionsversuche mit kommerziellen Inhibitoren wurden die Zellen nach Splitten auf die 6-Well Platte für 18 Stunden mit dem jeweiligen Inhibitor versetzt. Anschließend wurden die Zellen für sechs weitere Stunden mit dem Inhibitor und hC0-C1f simultan behandelt. Hierfür wurden folgende Inhibitoren verwendet: Bay 11-7082 (NF $\kappa$ B-Inhibitor, InvivoGen), CLI095 (TLR4-Inhibitor, InvivoGen.), CuCPT22 (TLR2/TLR1-Inhibitor, Tocris Bioscience) sowie FPS-ZM1 (RAGE Inhibitor, Calbiochem).

### 2.2.10 Quanterix TNF- $\alpha$ Assay

Die TNF- $\alpha$  Konzentration im Medium der murinen kardialen Fibroblasten wurde nach Stimulation mit Hilfe eines eigens hierfür etablierten TNF- $\alpha$  ELISAs auf dem Quanterix SR-X determiniert. Hierfür wurde das Simoa<sup>TM</sup> Mouse TNF- $\alpha$  Discovery Kit unter Beachtung des Quanterix Assay Conversion Guides (HD-1 to SR-X) nach Herstellerangaben verwendet. Die Kalibrierungskurve (Abbildung 9) wurde mit Hilfe einer logistischen Regression approximiert. Dies lieferte eine adäquate Approximation der Standardkurve ( $R^2 = 0,9987$ ). Die Proben wurden für die Messung vierfach verdünnt, um in dem optimalen, linearen Detektionsbereich des Assays zu liegen. Durch Messen von Duplikaten konnte zudem der Variationskoeffizient CV bestimmt werden, welcher durchschnittlich bei 8,6 % (Minimum 0,5 %; Maximum 24,9 %) lag.

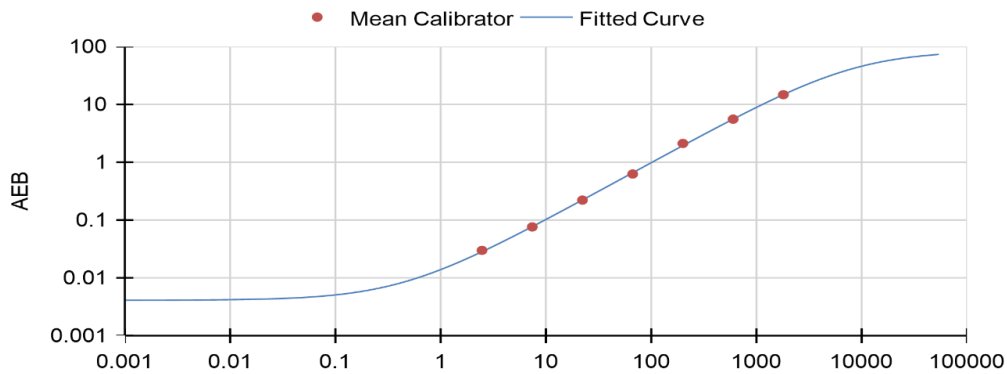


Abbildung 9: Kalibrierungskurve des neu etablierten Quanterix TNF- $\alpha$  Assays. Es zeigte sich bei logistischer Regression eine adäquate Approximation der gemessenen Werte ( $R^2 = 0,9987$ ).

### 2.2.11 RNA Isolation und quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Die Genexpression wurde mittels quantitativer Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) quantifiziert. Die Zellen wurden hierfür mittels QIAzol Lysis Reagent lysiert und nach Herstellerangaben mit dem RNeasy Mini Kit aufbereitet. Für die reverse Transkription und cDNA Amplifikation der isolierten RNA wurde das iScript<sup>TM</sup> verwendet. Die RT-qPCR wurde mit dem CFX96 Real-Time PCR System durchgeführt. Jede Probe wurde dreimal in einer 20  $\mu$ L Reaktion mit 10 nM Primer, SsoFast<sup>TM</sup>EvaGreen Supermix und 2  $\mu$ L cDNA (1:5 von 1  $\mu$ g total RNA) gemessen. Die Gesamtmenge der Ziel-mRNA wurde gegen Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (*GAPDH*) normalisiert. Die relative Quantifizierung der Genexpression von Proben gegen unbehandelte Kontrollen erfolgte mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode [84]. Zur Validierung und Optimierung der verwendeten Primer wurden Gradienten-PCRs als auch Agarose-Gele mit den amplifizierten PCR-Produkten durchgeführt. Es zeigte sich, dass alle verwendeten Primer ein Temperaturoptimum zwischen 58°C und 62°C haben. Das Amplikon zeigte im Agarose-Gel jeweils die erwartete Größe. Die Schmelzkurve jedes Primers zeigte lediglich einen Peak und es gab weder doppelte Banden noch eine Schmier im Gel des jeweiligen Amplikons, so dass es keinen Anhalt für unspezifische Bindungen (z.B. gDNA Bindung), Primer-Dimerisierungen oder andere Störungen der PCR gab.

Folgende Primer wurden für die Amplifikation der murinen cDNA verwendet:

<u>Target</u>	<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>
<i>Il-1<math>\beta</math></i>	Maus Il-1 $\beta$ (A) Forward (F)	CCCAACTGGTACATCAGCACCTC
	Maus Il-1 $\beta$ (A) Reverse (R)	GACACGGATTCCATGGTGAAGTC
<i>Il-6</i>	Il-6 (Mouse)-F	TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC
	Il-6 (mouse)-R	GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG
<i>Tnf-<math>\alpha</math></i>	Tnf- $\alpha$ (Mouse)-F	CCAGTGTGGGAAGCTGTCTT
	Tnf- $\alpha$ (Mouse)-R	AAGCAAAAGAGGAGGCAACA
<i>Tgf-<math>\beta</math></i>	Tgf-B-(Mouse)-F	TGACGTCACTGGAGTTGTACGG
	Tgf-B-(Mouse)-R	GGTTCATGTCATGGATGGTGC
<i>Agtr1</i>	Mm_Agtr1_1_SG	QT00261464
<i>Gapdh</i>	Mm_GAPDH_3_SG	QT01658692
<i>Tnf-<math>\alpha</math></i>	Mm_Tnf_1_SG	QT00104006
<i>Acta2</i>	Mm_Acta2_1_SG	QT00140119
<i>Colla1</i>	Mm_Coll1a1_2_SG	QT02589482
<i>Mmp-9</i>	Mm_Mmp9_1_SG	QT00108815

Tabelle 11: Verwendete Primer für RT-qPCR muriner Gene.

Folgende Primer wurden zur Amplifikation der humanen cDNA verwendet:

<u>Target</u>	<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>
<i>GAPDH</i>	GAPDH (Human) – F	CCTCAAGATCATCAGCAATGCCTCCT
	GAPDH (Human) – R	GGTCATGAGTCCTTCACGATACCAA
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	IL1B (Human) – F	TCCCCAGCCCTTTTGTGTA
	IL1B (Human) – R	TTAGAACCAAATGTGGCCGTG
<i>ACTA2</i>	ACTA2 (Human) – F	ACCATGAAGATCAAGATCATTGCC
	ACTA2 (Human) – R	AAACACATAGGTAACGAGTCAGAG
<i>COL1A1</i>	QT00037793 (Hs_COL1A1_1_SG)	
<i>CXCL-1</i>	CXCL1 (Human) – F	TCACCCCAAGAACATCCAAAG
	CXCL1 (Human) – R	TGGATTTGTCACTGTTTCAGCA
<i>CCL-2</i>	CCL2 (Human) – F	GCAGCAAGTGTCCCAAAGAA
	CCL2 (Human) – R	CTGGGGAAAGCTAGGGGAAA
<i>IL-32</i>	IL32 (Human) – F	TCAAAGAGGGCTACCTGGAGAC
	IL32 (Human) – R	TCTGTTGCCTCGGCACCGTATT
<i>MMP-9</i>	QT00040040 (Hs_MMP9_1_SG)	
<i>TLR2</i>	TLR2 (Human) – F	CTTCACTCAGGAGCAGCAAGCA
	TLR2 (Human) – R	ACACCAGTGCTGTCCTGTGACA
<i>ICAM-1</i>	ICAM1 (Human) – F	TTGGGCATAGAGACCCCGTT
	ICAM1 (Human) – R	GCACATTGCTCAGTTCATACACC

Tabelle 12: Verwendete Primer für RT-qPCR humaner Gene.

Die initiale Denaturierung erfolgte bei 95°C für fünf Minuten. Anschließend wurden 40 Zyklen der Denaturierung (30 Sekunden, 95°C), Anlagerung (30 Sekunden, 60°C) und Verlängerung (30 Sekunden, 72°C) zur Amplifizierung durchgeführt.

### 2.2.12 Microarray Analysen

Die isolierte Gesamt-RNA wurde amplifiziert und mit Hilfe des LIRAK Kits (Agilent) nach Herstellerangaben mit Cy3 gelabelt. Für jede Reaktion wurden 200 ng RNA verwendet. Die Cy3-gelabelte aRNA wurde über Nacht mit 8x60K 60-mer Oligonukleotiden-gespotteten Microarray Slides (Agilent Technologies, design ID 072363) hybridisiert. Hybridisierung, Waschen und Trocknen der Slides wurden ebenfalls nach Herstellerangaben durchgeführt. Die getrockneten Slides wurden mit einer Auflösung von 2 µm/Pixel mittels InnoScan is900 (Innopsys, Carbone, Frankreich) gescannt. Die Aufnahmen wurden mittels Mapix 6.5.0 Software analysiert und die berechneten Werte der Spots als GenePix results Files gespeichert. Anschließend erfolgte die Analyse mit R (Limma Package von BioConductor) [35, 124]. Die durchschnittlichen Signale der Spots wurden mit einem Offset von 1 unter Verwendung des NormExp-Verfahrens anhand der negativen Kontroll-Spots Hintergrund-korrigiert. Die Logarithmen der hintergrundkorrigierten Werte wurden Quantil-normalisiert [124]. Die normalisierten Werte wurden dann für Replikate der Spots pro Array gemittelt. Von verschiedenen Sonden, die dieselbe NCBI-Gen-ID adressierten, wurde in nachfolgenden Analysen die Sonde verwendet, die die maximale durchschnittliche Signalintensität zeigte. Die Gene wurden unter Verwendung einer moderierten t-Statistik hinsichtlich ihrer differentiellen Expression bewertet [124]. Signalweg-Analysen wurden unter Verwendung von Gen-Set-Tests auf den Rängen der t-Werte durchgeführt [124].

### 2.2.13 Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden mittels R (The R Foundation, Wien, Österreich), SPSS (Version 26, IBM, Armonk, USA) sowie GraphPad (Version 7, GraphPad, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben, sofern nicht anders angegeben. RT-qPCR Ergebnisse wurden mit Hilfe des R Packages *multcomp* analysiert. Mittelwerte zwischen Gruppen wurden hierfür mittels ungepaarter t-Tests mit gepoolter Varianz verglichen. Zu diesem Zweck wurde die Kontrollgruppe mit jeweils einer experimentellen Bedingung ohne Adjustierung für multiples Testen verglichen. Zum Vergleich der Mittelwerte von mehr als zwei Gruppen

## 2. Materialien und Methoden

wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Falls signifikante Abweichungen der Mittelwerte beobachtet wurden, erfolgten Post-hoc Mehrfachvergleiche mittels paarweiser t-Tests nach Dunnett. Hierbei wurden unstimulierte Proben als die Kontrollkategorie verwendet. Korrelationen zwischen Parametern wurden mit Hilfe des Pearsons Korrelationskoeffizienten bewertet. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Nachweis von cMyBP-C und C0-C1f im Menschen

##### 3.1.1 Charakterisierung der verwendeten Antikörper

Zur Charakterisierung der verwendeten Antikörper wurden folgende rekombinant hergestellten Peptide verwendet: Humanes C0-C1f (hC0-C1f), murines C0-C1f (mC0-C1f), murines C0-C1 (mC0-C1), murines C0-L (mC0-L) sowie murines C0-C2 (mC0-C2). Im Western Blot zeigte sich, dass der Depletionsantikörper (I1) humanes cMyBP-C sowie mC0-C2 detektiert. HC0-C1f sowie mC0-L, mC0-C1 und mC0-C1f wurden hingegen nicht durch I1 gebunden (Abbildung 10A). Der Antikörper E7 konnte alle Fragmente des cMyBP-C unabhängig von der Spezies im Western Blot detektieren (Abbildung 10B). Analog wurde der eigens gegen hC0-C1f entwickelte Antikörper (H8) charakterisiert. H8 detektierte speziesunabhängig alle getesteten rekombinanten Fragmente des cMyBP-C (Abbildung 10C).

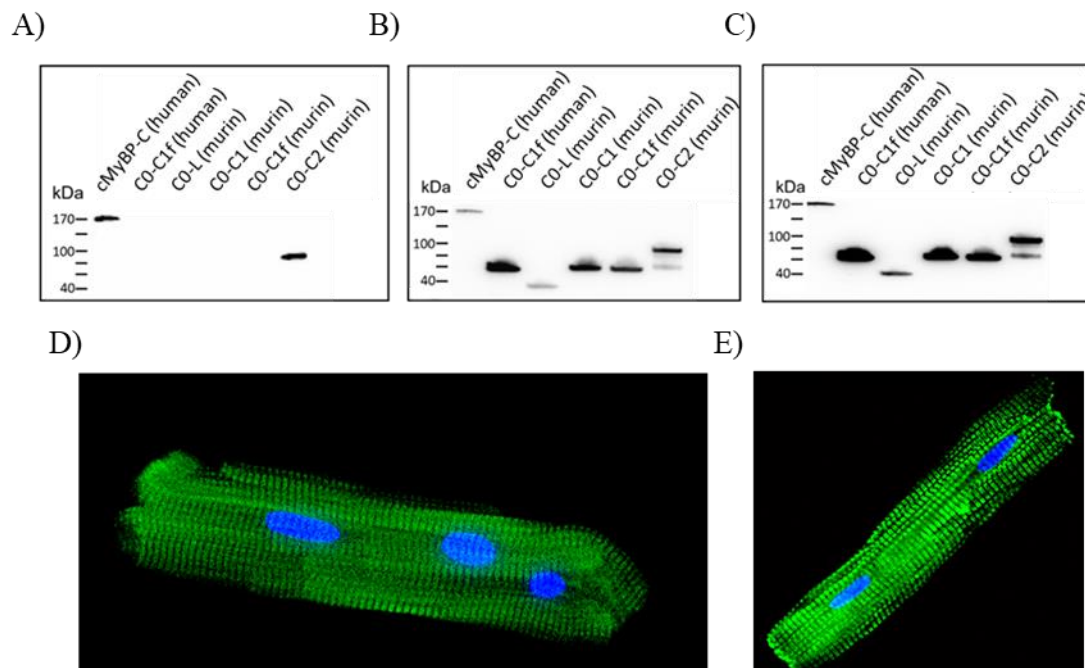


Abbildung 10: Charakterisierung der verwendeten Antikörper. (A) – (C): Western Blot mit rekombinantem humanem cMyBP-C, humanem C0-C1f, murinem C0-L, murinem C0-C1, murinem C0-C1f und murinem C0-C2. Zur Detektion der cMyBP-C Fragmente wurde (A) der Depletionsantikörper I1, (B) der Antikörper E7 und (C) der Antikörper H8 verwendet. (D) – (E): Immunhistochemische Färbungen von Ratten-Kardiomyozyten mit dem (D) E7 Antikörper sowie (E) H8 Antikörper. Blau: DAPI.

Die verwendeten Antikörper detektieren die native Form des cMyBP-C in primären Kardiomyozyten (Spezies: Ratte) in immunhistochemischen Färbungen. Es zeigte sich eine Übereinstimmung der Periodizität des cMyBP-C auf den Aufnahmen mit E7 und H8 (repräsentative Bilder in Abbildung 10D und E).

Zusätzlich wurden Herzlysate sowie Lysate des Musculus tibialis anterior (TA) und des Musculus soleus (SOL) verwendet, um den H8-Antikörper detaillierter, insbesondere in Hinblick auf die nicht-kardialen Isoformen des MyBP-C, zu charakterisieren (Abbildung 11). Es wurde nur die kardiale Isoform des MyBP-C durch H8 detektiert.

Der Antikörper H8 war somit in der Lage, spezifisch das native cMyBP-C im Herzlysate zu detektieren (Abbildung 11).

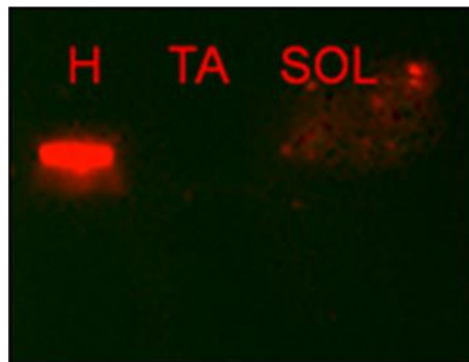


Abbildung 11: Repräsentativer Western Blot von murinem Herzlysate (H), Biopsien des *M. tibialis anterior* (TA) und *M. soleus* (SOL) mittels H8. Der Antikörper H8 detektierte lediglich die kardiale Isoform des MyBP-C.

Somit entsprach die Bindungsstelle von E7 sowie H8 der N-terminalen Region des cMyBP-C, so dass C0-C1f detektiert wurde, wohingegen I1 das Peptid C0-C1f nicht band (Abbildung 12).

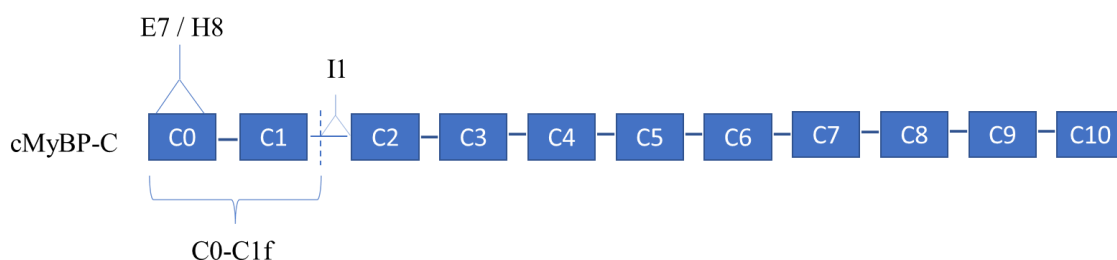


Abbildung 12: Bindungsstellen der Antikörper E7, H8 sowie I1.



### 3.1.2 Detektion von cMyBP-C und C0-C1f

Anschließend wurde die cMyBP-C Konzentration im Serum von ACS Patienten ( $n = 19$ ) mit Hilfe eines kommerziellen ELISAs (Elabscience) gemessen. Die gemessenen Konzentrationen lagen in allen Fällen oberhalb der Detektionsgrenze des Kits (Abbildung 13).

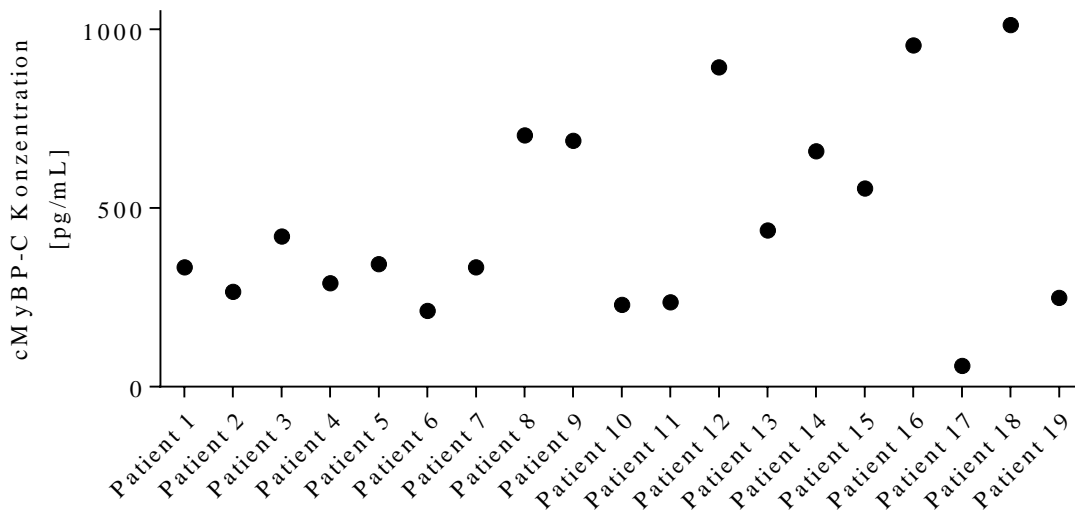


Abbildung 13: cMyBP-C Konzentration in 19 Patienten mit ACS.

Es zeigte sich eine große Varianz zwischen den einzelnen Proben ( $\min(c(\text{cMyBP-C})) = 58 \text{ pg/mL}$ ,  $\max(c(\text{cMyBP-C})) = 1011 \text{ pg/mL}$ ). Interessanterweise korrelierte die cMyBP-C Konzentration nicht mit dem geschätzten Eintrittszeitpunkt der Symptomatik ( $r = -0,023$ ,  $p = 0,938$ ). Es zeigte sich jedoch eine moderate Korrelation mit der HbA1c Konzentration im Blut der Patienten ( $r = 0,299$ ,  $p = 0,320$ ), TnT ( $r = 0,196$ ,  $p = 0,503$ ), TnI ( $r = 0,207$ ,  $p = 0,518$ ), CK ( $r = 0,400$ ,  $p = 0,157$ ), sowie CK-MB ( $r = 0,582$ ,  $p = 0,060$ ). Es gab keine relevante Korrelation der cMyBP-C Konzentration mit der Nierenfunktion (Kreatinin:  $r = -0,034$ ,  $p = 0,909$ ).

Um die C0-C1f Konzentration separat von der gesamten cMyBP-C Konzentration zu bestimmen, wurden Fragmente, die länger als C0-C1f sind (insbesondere das cMyBP-C voller Länge), depletiert. Zur Verifizierung der Effizienz der Depletion sind zwei Proben hergestellt worden: Die erste (Spalte 1) beinhaltete  $500 \text{ ng/mL}$  cMyBP-C. Dieselbe Probe wurde anschließend mit der zuvor beschriebenen Depletionsmethode unter Verwendung des Antikörpers I1 depletiert. Die depletierte Probe wurde in Spalte 2 aufgetragen. Als

Primärantikörper für den Western Blot wurde der E7 verwendet. Es zeigte sich im Western Blot, dass ein deutliches Signal in Spalte 1 von cMyBP-C vorhanden ist. In Spalte 2 ist hingegen keine Bande detektierbar (Repräsentative Abbildung 14A).

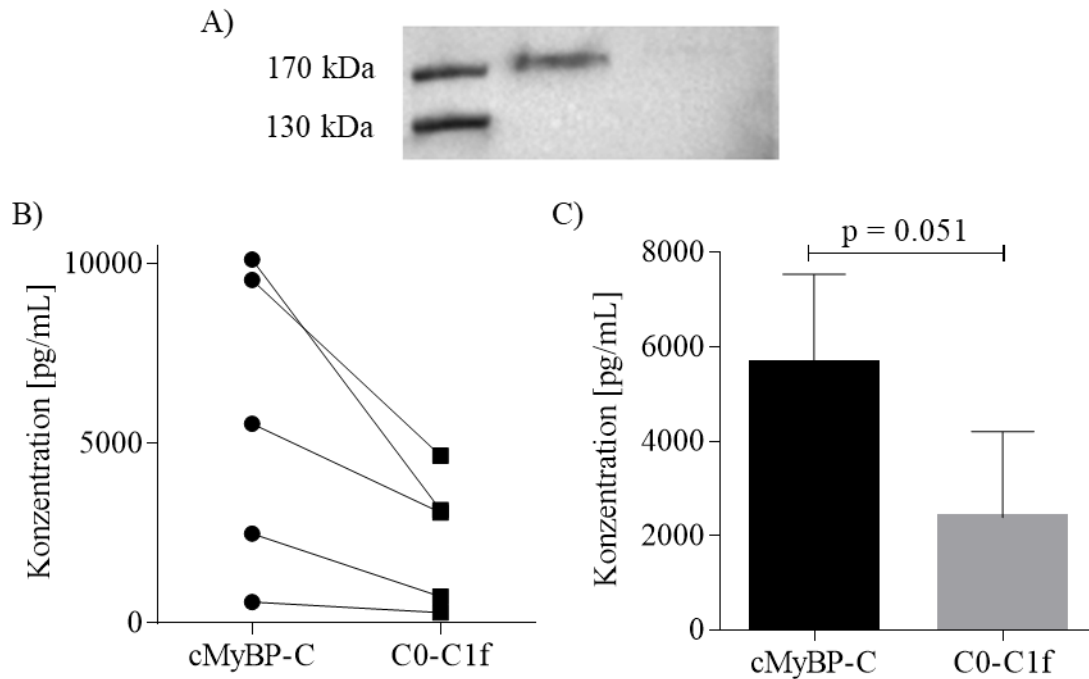


Abbildung 14: (A) Depletion von cMyBP-C mittels I1. In Spalte 1 war eine deutliche Bande des cMyBP-C erkennbar. In der depletierten Probe hingegen war diese Bande nicht mehr detektierbar. (B) und (C): Proof-of-principle: Depletion von fünf Proben von Patienten mit ACS.

Die Depletion war somit selbst bei hohen cMyBP-C Konzentrationen effizient. Fünf der 19 Proben wurden mit der Depletionsmethode behandelt, um zusätzlich die C0-C1f Konzentration zu bestimmen (Abbildung 14B). Es zeigte sich erwartungsgemäß, dass die C0-C1f Konzentration unterhalb der gesamten cMyBP-C Konzentration (inklusive C0-C1f) liegt. Die C0-C1f Konzentration lag zwischen 287 pg/mL und 4651 pg/mL (Mittelwert:  $2378 \pm 1826$  pg/mL). Im direkten Vergleich war 40 % [min 29 %, max 56 %] des freigesetzten cMyBP-C auf das Peptid C0-C1f zurückzuführen (Abbildung 14C).

### 3.2 Einfluss von C0-C1f auf Fibroblasten

Da C0-C1f einen erheblichen Anteil des freigesetzten cMyBP-C in Patienten mit einem ACS ausmacht, stellt sich die Frage nach seiner funktionellen Bedeutung im Krankheitsprozess. Da bereits beschrieben wurde, dass eine Überexpression von C0-C1f

im Tiermodell zu verschiedenen Pathologien führt, bei denen Fibroblasten ätiologisch relevant sind, wurde der Einfluss von C0-C1f auf Fibroblasten untersucht [97, 98].

### 3.2.1 Etablierung der Isolation von murinen kardialen Fibroblasten

Es wurden drei verschiedene Isolationsmethoden etabliert und verglichen, um a priori potenzielle Effekte der Isolationsmethode per se auf die Differenzierbarkeit von Fibroblasten und somit auf die Versuchsergebnisse zu determinieren. Hierbei handelte es sich um (i) einen enzymatischen Verdau des Herzens, (ii) das Langendorff-Perfusionsmodell sowie (iii) das Ausplattieren von Gewebstückchen.

Zunächst wurden die Zellen am jeweiligen Tag des Experimentes lichtmikroskopisch in Hinblick auf Morphologie und Zellzahl verglichen.

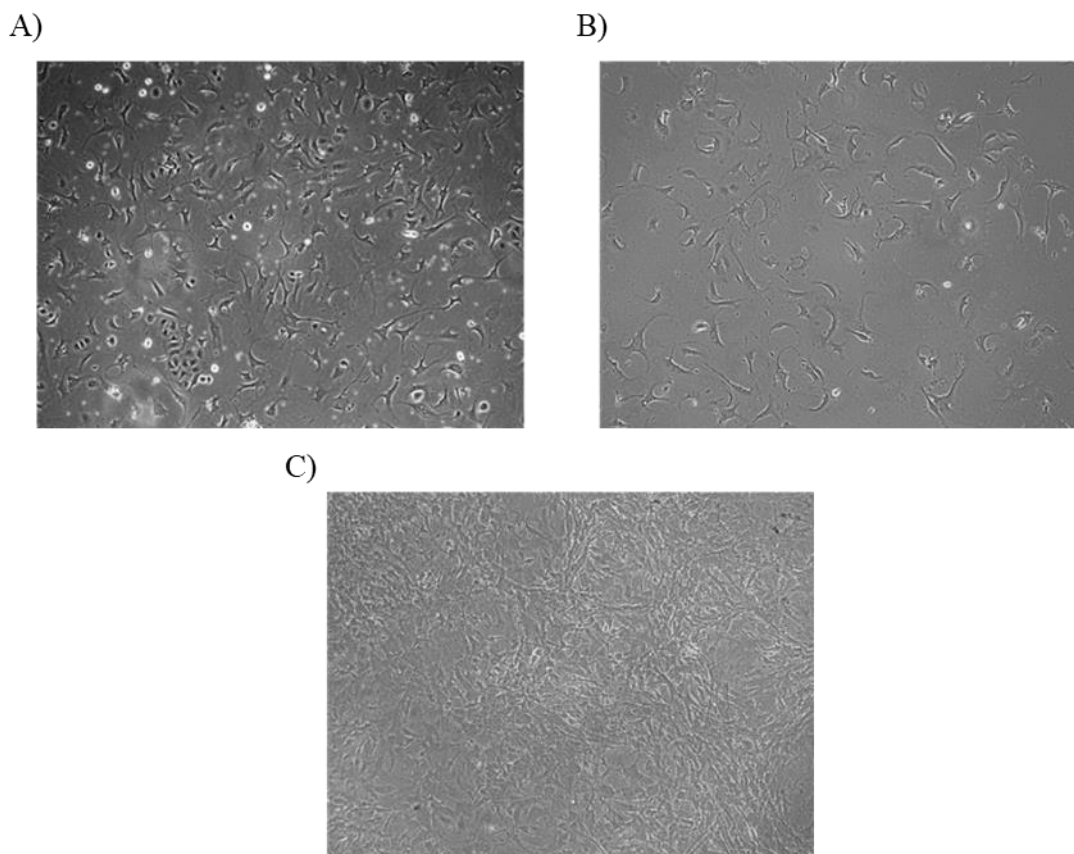


Abbildung 15: Morphologischer Vergleich der angewandten Isolationsmethoden. (A) Verdau-Methode: Drei Tage nach der Isolation (Tag der Stimulation), (B) Langendorff-Perfusion: Vier Tage nach der Isolation (Tag der Stimulation), (C) Gewebstückchen-Methode: Zehn Tage nach der Isolation (Passage 1, Tag der Stimulation bzw. des Passagierens)

Lichtmikroskopisch unterschied sich die Morphologie der primären Zellen lediglich marginal (Abbildung 15). Die Zellen aus der Langendorff-Perfusion sowie aus der

Verdau-Methode waren nicht passagierbar. Die Zellen aus der Gewebstückchen-Methode hingegen waren passagierbar und es zeigten sich keine morphologischen Unterschiede zwischen den einzelnen Passagen. Dementsprechend war die Zellzahl aufgrund der Expandierfähigkeit von der Isolationsmethode abhängig.

Die murinen kardialen Fibroblasten wurden anschließend mittels immunhistochemischer Färbungen genauer charakterisiert. Hierfür wurden die ausplattierten Zellen mit Antikörpern gegen Vimentin (grün dargestellt) sowie Antikörpern gegen  $\alpha$ SMA (rot dargestellt) gefärbt (Abbildung 16, repräsentativ für alle getesteten Isolationsmethoden). Es konnte gezeigt werden, dass die isolierten und kultivierten Zellen positiv für Vimentin und weitestgehend positiv für  $\alpha$ SMA angefärbt wurden (Abbildung 16).

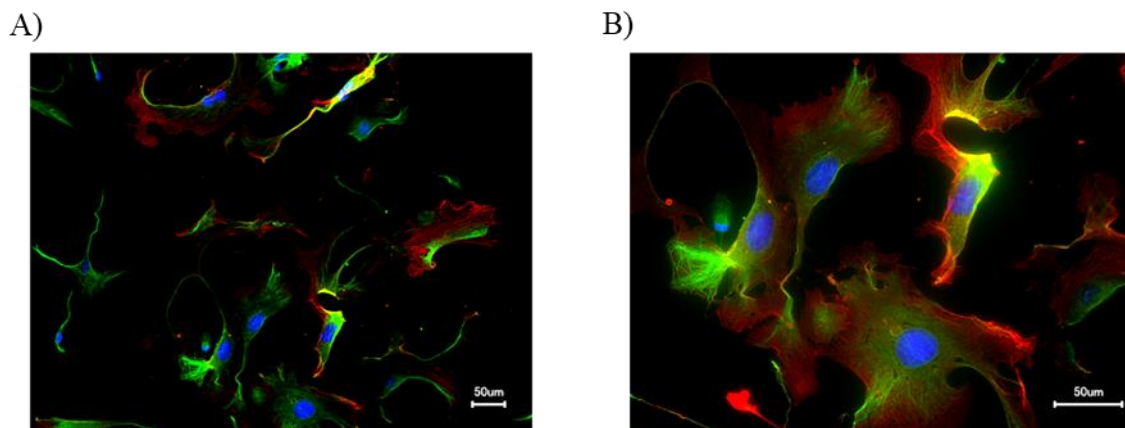


Abbildung 16: Immunhistochemische Färbungen von murinen kardialen Fibroblasten mit Vimentin (grün) und  $\alpha$ SMA (rot) sowie DAPI (blau). (A) 20-fache Vergrößerung (B) 40-fache Vergrößerung.

Zusätzlich wurden die isolierten Zellen mit Antikörpern gegen CD68 angefärbt, wodurch Makrophagen markiert wurden. CD68<sup>+</sup> Zellen sind grün dargestellt (Abbildung 17).

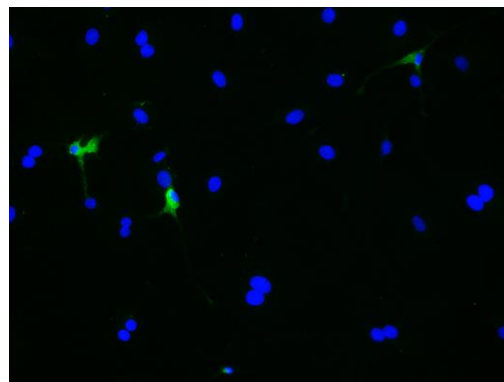


Abbildung 17: Färbung der primären Zellen mit Antikörpern gegen CD68 (grün) sowie DAPI (blau), 20-fache Vergrößerung.

Es zeigten sich vereinzelt CD68<sup>+</sup> Zellen (Repräsentative Aufnahme in Abbildung 17).

Mittels RT-qPCR wurde die *Acta2* mRNA Abundanz der auf verschiedene Art und Weise isolierten Fibroblasten nach 24-stündiger Stimulation mit TGF- $\beta$  verglichen. *Acta2*, welches für das Protein  $\alpha$ SMA kodiert, ist einer der Standardmarker für die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Es konnte gezeigt werden, dass die Isolationsmethode keinen wesentlichen Einfluss auf die *Acta2* Genexpressionsveränderungen nach TGF- $\beta$  Stimulation hat (Abbildung 18). Die Induktion von *Acta2* durch TGF- $\beta$  verhielt sich bei allen Isolationsmethoden ähnlich und unterschied sich nicht wesentlich ( $1,9 \pm 0,1$ -fache Induktion (Verdau-Methode),  $1,8 \pm 0,1$ -fach (Gewebsstückchen-Methode),  $1,6 \pm 0,1$ -fach (Langendorff), je  $n = 2$ ).

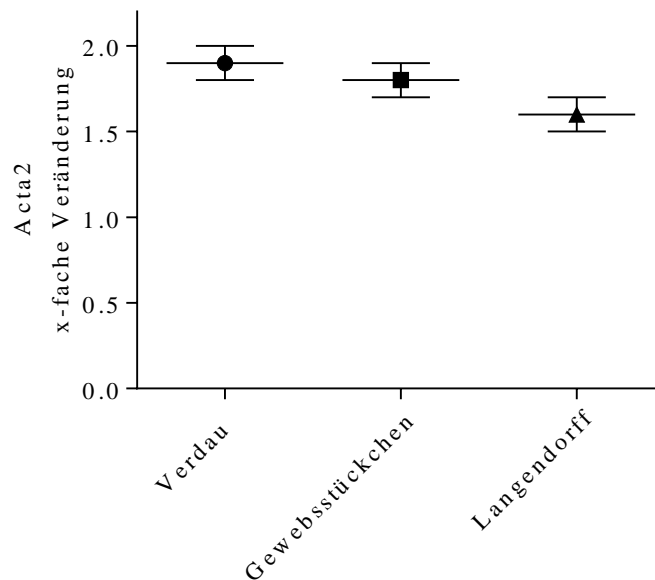


Abbildung 18: *Acta2* Genregulation nach 24-stündiger Stimulation mit TGF- $\beta$  in Abhängigkeit von der Isolationsmethode. Nach 24-stündiger Stimulation der murinen kardialen Fibroblasten mit TGF- $\beta$  zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede durch die Isolationsmethode bezüglich der *Acta2* mRNA Induktion (je  $n = 2$ ).

Da im Rahmen der Charakterisierung keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Isolationsmethoden beobachtbar waren, wird im Folgenden nicht zwischen den Isolationsmethoden differenziert. Da bei der Isolation von Kardiomyozyten via Langendorff-Methode Fibroblasten als Nebenprodukt anfallen und die Gewebstückchen-Methode expandierbar war und somit die höchste Zellzahl lieferte, wurden zwecks Minimierung an Versuchstieren vorwiegend diese Isolationsmethoden verwendet.

### 3.2.2 Einfluss von C0-C1f auf primäre murine kardiale Fibroblasten

Expressionsveränderungen auf mRNA-Ebene wurden sowohl nach sechsständiger als auch nach 48-stündiger Stimulation mit den verschiedenen Peptiden (mC0-C1f, TGF- $\beta$  oder LPS) beobachtet. Es wurden sowohl pro-inflammatorische Gene (*Il-1 $\beta$* , *Il-6*) als auch *Mmp-9* evaluiert.

Zunächst wurden die murinen kardialen Fibroblasten für sechs Stunden mit mC0-C1f, TGF- $\beta$  oder LPS stimuliert (Abbildung 19). Hierfür wurden die Zellen von der 6 cm bzw. 10 cm Zellkulturschale auf 6-Well Platten gesplittet. 24 Stunden später wurden die Zellen stimuliert. *Il-1 $\beta$*  wurde sowohl durch LPS als auch durch mC0-C1f signifikant hochreguliert, wohingegen TGF- $\beta$  zu keiner Induktion von *Il-1 $\beta$*  führte ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $9,3 \pm 1,2$ ,  $p < 0,001$  (mC0-C1f),  $9,9 \pm 0,8$ ,  $p < 0,001$  (LPS),  $0,5 \pm 1,8$ ,  $p = 0,314$  (TGF- $\beta$ )). *Il-6* wurde im Vergleich zu *Il-1 $\beta$*  deutlich schwächer induziert (Abbildung 19). Sowohl mC0-C1f als auch TGF- $\beta$  und LPS induzierten *Il-6* ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $2,5 \pm 1,0$ ,  $p < 0,001$  (mC0-C1f),  $3,9 \pm 0,5$ ,  $p < 0,001$  (LPS),  $2,6 \pm 0,7$ ,  $p < 0,001$  (TGF- $\beta$ )).

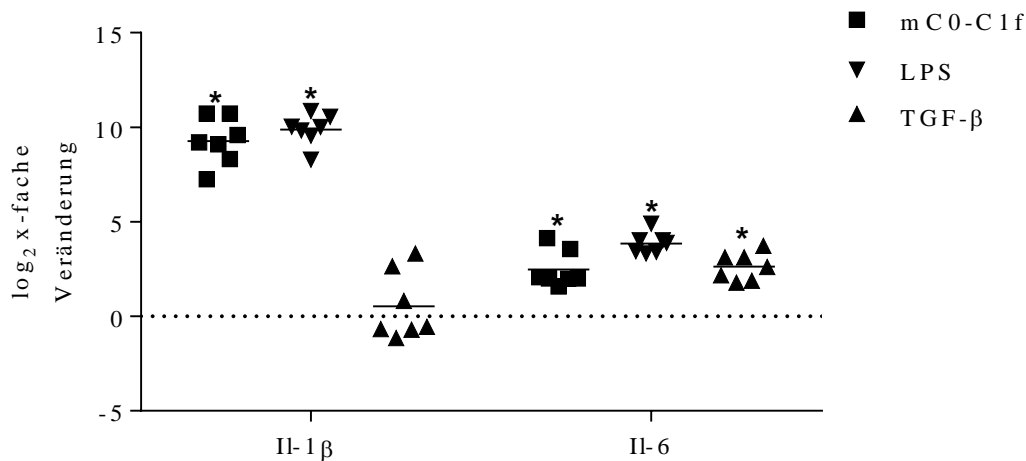


Abbildung 19: Induktion pro-inflammatorischer Zytokine nach sechsständiger Stimulation von murinen kardialen Fibroblasten mit mC0-C1f, TGF- $\beta$  sowie LPS. mC0-C1f und LPS zeigten eine signifikante Induktion von *Il-1 $\beta$*  und *Il-6*. TGF- $\beta$  zeigte ebenfalls eine signifikante Induktion von *Il-6*, wohingegen *Il-1 $\beta$*  lediglich marginal durch TGF- $\beta$  beeinflusst wurde. \* = statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

*Mmp-9* wurde durch mC0-C1f, TGF- $\beta$  und LPS induziert ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $3,0 \pm 0,6$ ,  $p < 0,001$  (mC0-C1f),  $4,1 \pm 0,6$ ,  $p < 0,001$  (LPS),  $1,7 \pm 0,7$ ,  $p = 0,002$  (TGF- $\beta$ ), Abbildung 20).

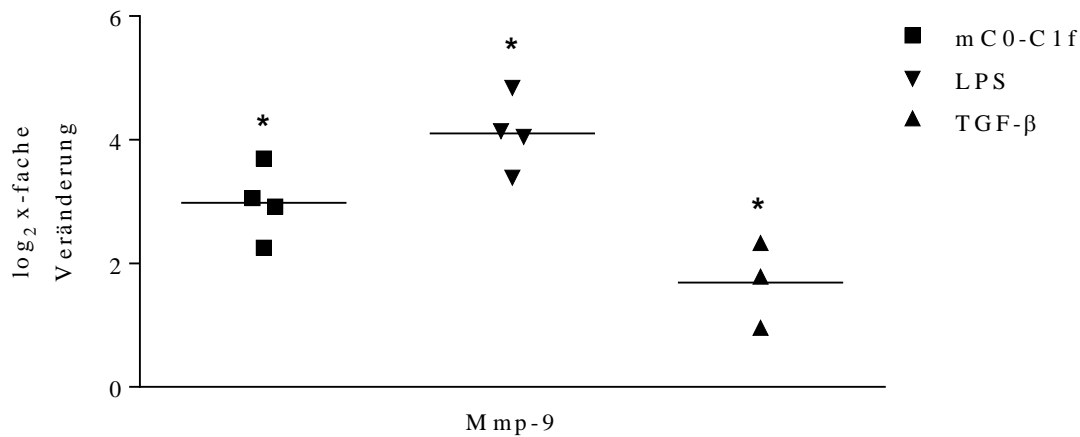


Abbildung 20: Beeinflussung von *Mmp-9* nach sechsständiger Stimulation von murinen kardialen Fibroblasten mit mC0-C1f, LPS und TGF-β. \* = statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

Zusammenfassend wurden somit nach sechsständiger Stimulation mit mC0-C1f proinflammatorische Zytokine sowie *Mmp-9* signifikant induziert.

Nach 48-stündiger Stimulation mit mC0-C1f, LPS sowie TGF-β wurde die mRNA-Expressionsveränderung von *Il-1β* als inflammatorischer Marker, *Mmp-9* als Marker für extrazelluläres Remodeling, *Acta2* als Zeichen der Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten sowie des Angiotensin II Rezeptors Typ I (*Agtr1*) beobachtet.

Es war weiterhin eine Induktion von *Il-1β* durch mC0-C1f sowie LPS beobachtbar ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $7,3 \pm 0,9$ ,  $p < 0,001$  (mC0-C1f),  $8,7 \pm 0,7$ ,  $p < 0,001$  (LPS)). TGF-β führte zu keiner Hochregulation von *Il-1β* ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $-1,0 \pm 1,5$ ,  $p = 0,170$ ). Die *Mmp-9* mRNA wurde durch mC0-C1f und LPS signifikant induziert ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $5,9 \pm 0,7$ ,  $p < 0,001$  (mC0-C1f),  $4,5 \pm 2,8$ ,  $p < 0,001$  (LPS)). Durch TGF-β war ebenfalls eine Induktion der *Mmp-9* mRNA zu beobachten ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $2,2 \pm 2,5$ ,  $p = 0,031$ ). Die *Acta2* mRNA wurde nach 48-stündiger Stimulation mit TGF-β tendenziell hochreguliert ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $0,8 \pm 0,2$ ,  $p = 0,215$ ). Die Stimulation der Zellen mit mC0-C1f führte jedoch analog zu LPS zu einer Reduzierung der *Acta2* mRNA-Expression ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $-1,2 \pm 0,5$ ,  $p = 0,079$  (mC0-C1f),  $-2,2 \pm 2,0$ ,  $p = 0,005$  (LPS)). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass TGF-β keinen Einfluss auf die mRNA Abundanz des *Agtr1* hat, wohingegen LPS und mC0-C1f die mRNA-Expression tendenziell induzierten ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $0,9 \pm 0,6$ ,  $p = 0,206$  (mC0-C1f),  $1,5 \pm 2,0$ ,  $p = 0,058$  (LPS),  $-0,7 \pm 1,0$ ,  $p = 0,362$  (TGF-β)).

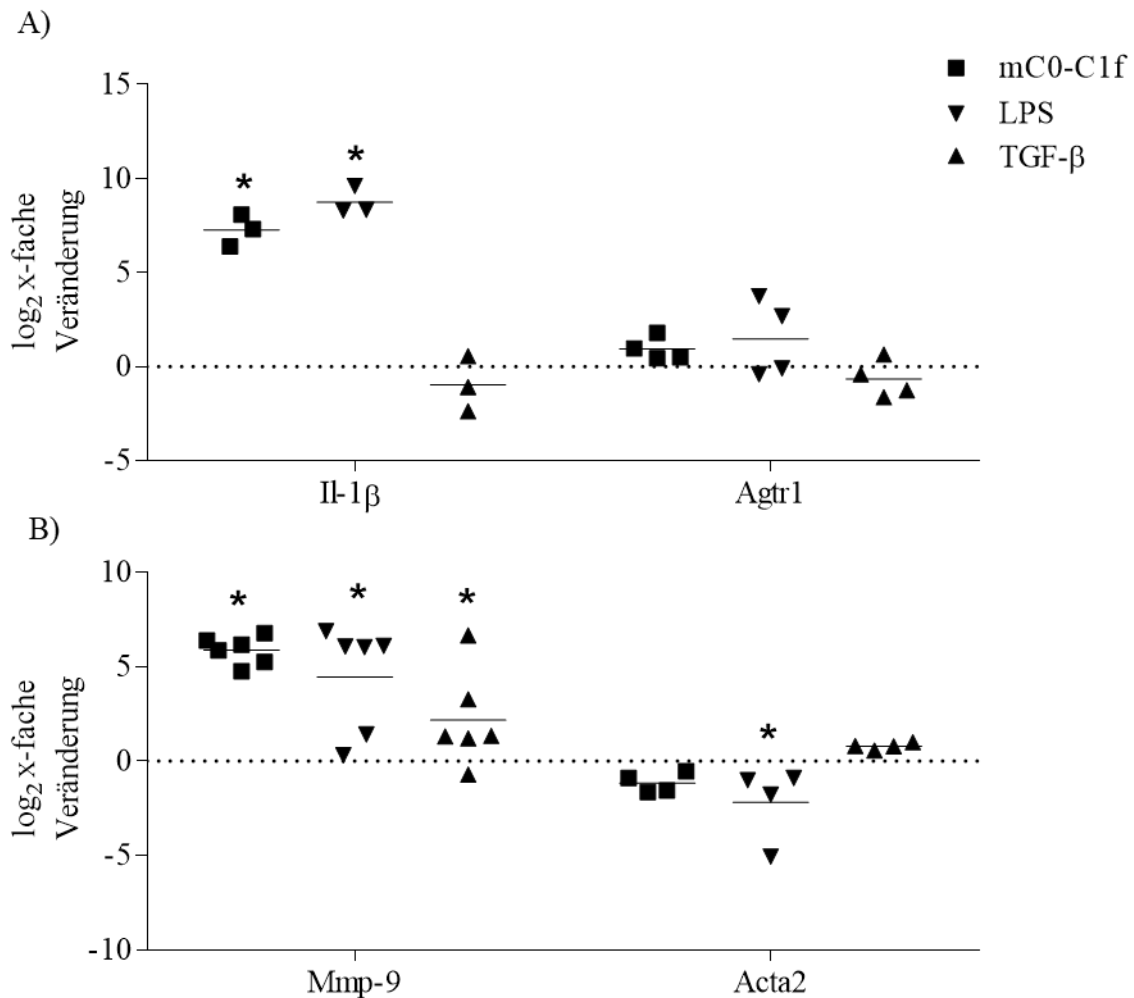


Abbildung 21: Regulation der Gene für (A) *Il-1β*, *Agtr1* sowie (B) *Mmp-9* und *Acta2* nach 48-stündiger Stimulation von murinen kardialen Fibroblasten mit *mC0-C1f*, *TGF-β* und *LPS*. *Mmp-9* und *Il-1β* wurden durch *mC0-C1f* signifikant induziert, wohingegen *Acta2* tendenziell inhibiert wurden. *LPS* zeigte eine Induktion von *Mmp-9* und *Il-1β*, *Acta2* wurde hingegen inhibiert. *TGF-β* zeigte eine Induktion von *Mmp-9* und *Acta2*, wohingegen *Agtr1* und *Il-1β* nicht wesentlich beeinflusst wurden. \* = statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

### TNF- $\alpha$ Freisetzung durch C0-C1f: Bead-basierte Protein Messungen

Mit Hilfe eines Bead-basierten TNF- $\alpha$  Assays wurde die TNF- $\alpha$  Konzentration im Überstand der murinen kardialen Fibroblasten gemessen. Hierfür wurden die Zellen sechs bzw. 48 Stunden mit *mC0-C1f*, *LPS* oder *TGF-β* stimuliert. Der Überstand enthielt jeweils 2 mL Medium.

Es konnte gezeigt werden, dass *mC0-C1f* sowie *LPS* zu einer signifikanten Freisetzung von TNF- $\alpha$  führten, wohingegen *TGF-β* keine Induktion von TNF- $\alpha$  zeigte. Dies gilt sowohl nach sechsständiger Stimulation ( $0,8 \pm 0,7$  pg/mL (neg. Kontrolle) vs  $944 \pm 568$  pg/mL,  $p = 0,006$  (*mC0-C1f*) bzw.  $1576 \pm 1060$  pg/mL,  $p = 0,01$  (*LPS*) bzw.  $2 \pm 1$  pg/mL,



$p = 0,162$  (TGF- $\beta$ )) als auch nach 48-stündiger Stimulation ( $5 \pm 3$  pg/mL (neg. Kontrolle) vs  $2291 \pm 1228$  pg/mL  $p = 0,010$  (mC0-C1f) bzw.  $3296 \pm 1897$  pg/mL  $p = 0,013$  (LPS) bzw.  $23 \pm 17$  pg/mL,  $p = 0,081$  (TGF- $\beta$ ), Abbildung 22).

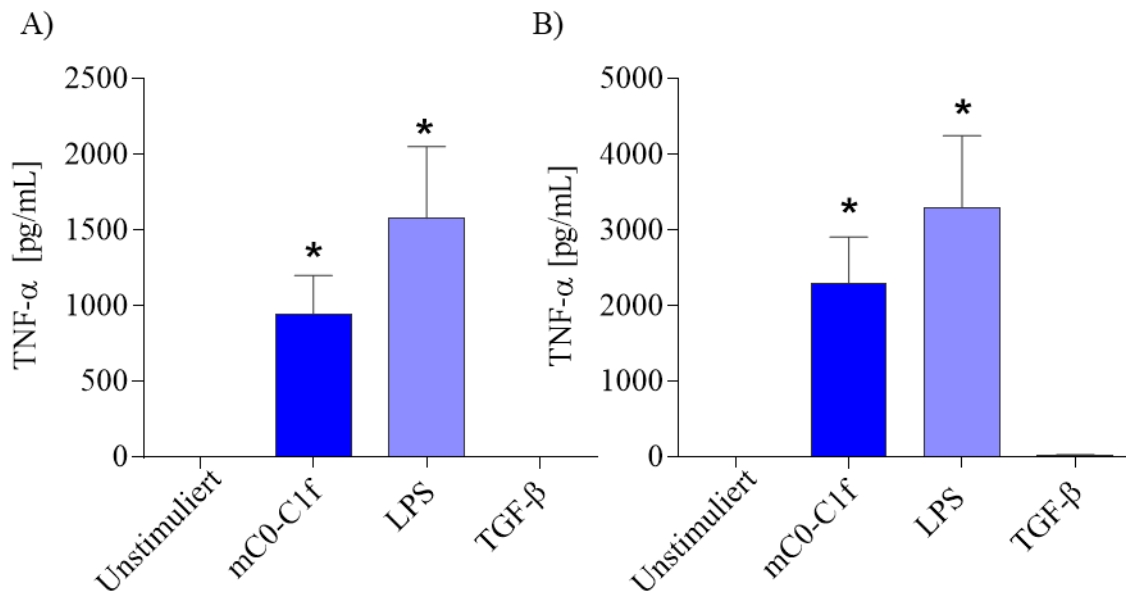


Abbildung 22: TNF- $\alpha$  Freisetzung nach (A) sechsstündiger und (B) 48-stündiger Stimulation mit mC0-C1f, LPS und TGF- $\beta$ . Im Vergleich zu unstimulierten Kontrollproben wurde sowohl nach sechs als auch nach 48 Stunden TNF- $\alpha$  durch mC0-C1f und LPS auf Proteinebene signifikant hochreguliert. TGF- $\beta$  zeigte keine Beeinflussung von TNF- $\alpha$ . Jeweils  $n = 3$ . \* = statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

### Regulation der EZM-Produktion

Auf Protein-Ebene wurde zusätzlich mittels Western-Blots die intrazelluläre Expression von Kollagen Typ 1 (COL1) überprüft. TGF- $\beta$  führte nach 48-stündiger Stimulation zu einer Induktion von COL1. Es gab jedoch keine wesentliche Beeinflussung des COL1 durch mC0-C1f und LPS (Repräsentativer Western Blot in Abbildung 23).

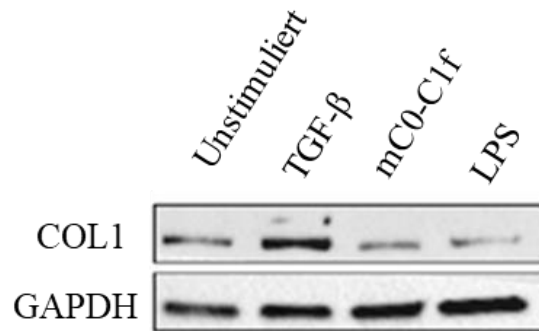


Abbildung 23: Repräsentativer Western Blot für COL1 nach 48-stündiger Stimulation von murinen kardialen Fibroblasten mit TGF- $\beta$ , mC0-C1f und LPS. Die 133 kDa große Isoform des COL1 wurde durch 48-stündige Stimulation mit TGF- $\beta$  induziert. mC0-C1f und LPS zeigten keine wesentliche Induktion des COL1 auf Proteinebene.

### 3.2.3 Einfluss von C0-C1f auf humane Fibroblasten

Um die Aktivierung von Fibroblasten durch C0-C1f detaillierter zu untersuchen, wurde auf eine immortalisierte Zelllinie zurückgegriffen. Dies erlaubte aufgrund der deutlich höheren Zellzahl eine Vielzahl von Experimenten und das Testen eines weiteren N-terminalen Fragmentes des cMyBP-C (C0-L), ohne ethische Bedenken aufgrund hoher Versuchstierzahlen. Vorteilhaft ist zudem, dass durch Analyse der Funktion des C0-C1f auf diese immortalisierte Zelllinie eine präzise Aussage über die Fibroblasten getroffen werden kann, da keine Verunreinigungen mit anderen Zellen (z.B. CD68<sup>+</sup> Zellen) vorhanden sind.

#### Einfluss von C0-C1f auf humane Fibroblasten: Genexpressionsanalysen

Zunächst wurden Marker, die in den primären kardialen Fibroblasten reguliert wurden, in den humanen Zellen evaluiert. Hierfür wurde die *IL-1 $\beta$*  mRNA als inflammatorischer Marker sowie die *COL1A1* mRNA und *ACTA2* mRNA als fibrotische Marker mittels RT-qPCR nach 24-stündiger Stimulation analysiert (Abbildung 24). *IL-1 $\beta$*  wurde durch LPS und hC0-C1f, jedoch nicht durch C0-L induziert ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $1,2 \pm 1,1$ ,  $p = 0,083$  (hC0-C1f),  $1,6 \pm 1,0$ ,  $p = 0,026$  (LPS),  $0,5 \pm 1,3$ ,  $p = 0,598$  (C0-L)). TGF- $\beta$  reduzierte hingegen die *IL-1 $\beta$*  mRNA ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $-1,9 \pm 1,9$ ,  $p = 0,005$ ). *ACTA2* wurde durch hC0-C1f nicht beeinflusst, wohingegen *COL1A1* zu diesem Zeitpunkt durch hC0-C1f tendenziell supprimiert wurde ( $\log_2$  x-fache Veränderung *ACTA2*:  $0,02 \pm 1,2$ ,  $p = 0,96$ , *COL1A1*:  $-0,3 \pm 0,6$ ,  $p = 0,156$ ); TGF- $\beta$  führte jedoch zu einer Induktion dieser pro-fibrotischen Gene ( $\log_2$  x-fache Veränderung *ACTA2*:  $1,9 \pm 1,0$ ,  $p < 0,001$ , *COL1A1*:  $1,6 \pm 0,3$ ,  $p < 0,001$ ). LPS und C0-L beeinflussten *ACTA2* sowie

*COL1A1* nicht signifikant ( $\log_2$  x-fache Veränderung *ACTA2*:  $0,4 \pm 1,5$ ,  $p = 0,35$  (LPS),  $0,4 \pm 1,4$ ,  $p = 0,40$  (C0-L), *COL1A1*:  $-0,2 \pm 0,6$ ,  $p = 0,178$  (LPS),  $-0,2 \pm 0,7$ ,  $p = 0,313$  (C0-L)).

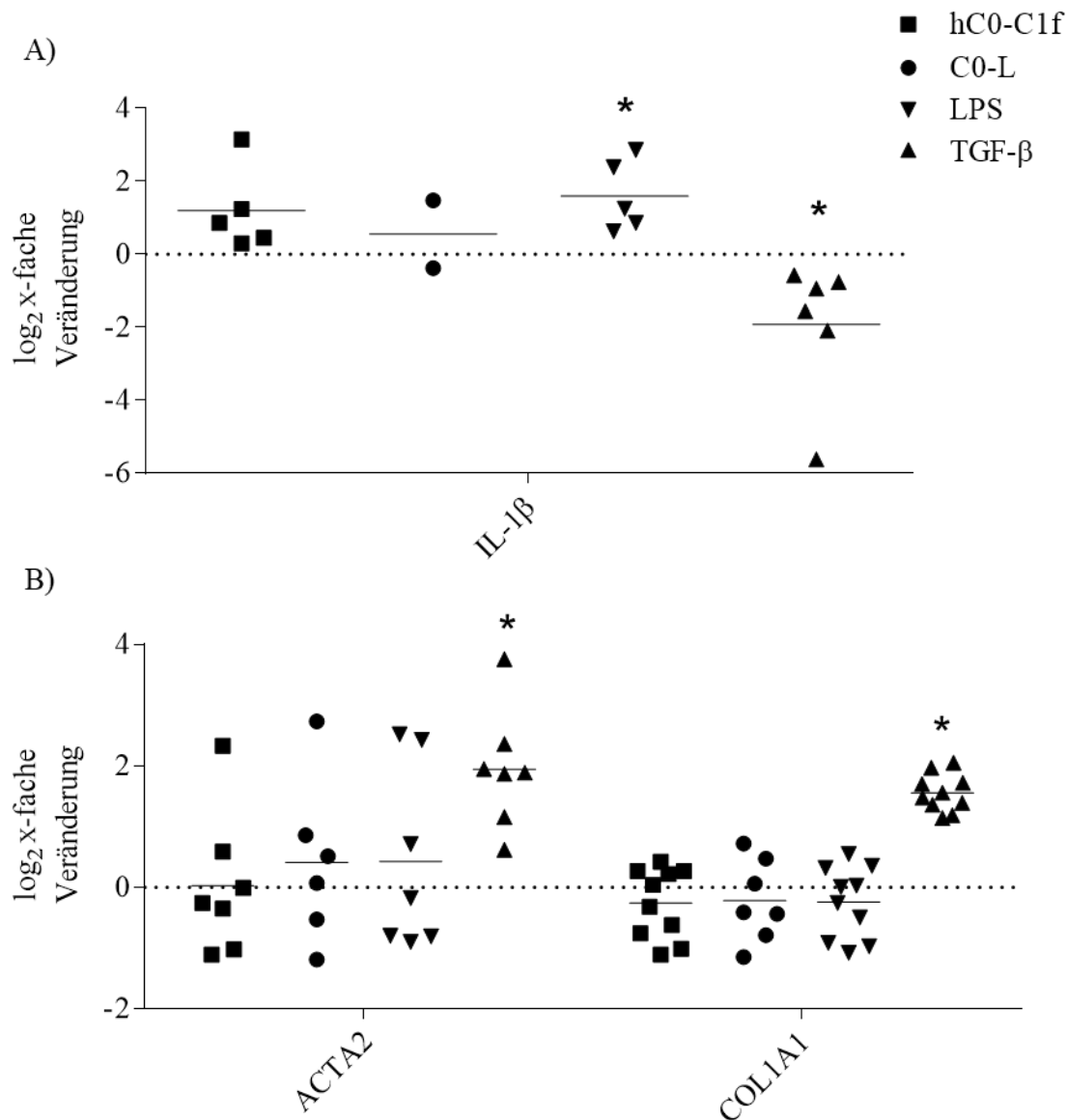


Abbildung 24: Einfluss von TGF- $\beta$ , hC0-C1f, LPS und C0-L auf (A) *IL-1 $\beta$*  sowie (B) fibrotische Gene in humanen Fibroblasten. Es zeigte sich eine zu den kardialen Fibroblasten analoge Regulierung der beobachteten Gene nach 24-stündiger Stimulation. \* = statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ), [157].

Um einen globalen, unvoreingenommenen Überblick über die weiteren genetischen Veränderungen nach Stimulation mit den jeweiligen Peptiden zu erhalten, wurde ein mRNA Microarray für über 45000 Gene durchgeführt. Insgesamt wurden durch hC0-C1f 1233 Gene reguliert ( $|\log_2$  x-fache Veränderung| > 1), wohingegen durch C0-L lediglich 653 Gene reguliert wurden. 140 der beobachteten Gene wurden sowohl durch hC0-C1f

als auch durch C0-L reguliert. Der Vergleich von C0-L und hC0-C1f zeigte, dass zum Teil verschiedene Gene induziert bzw. supprimiert werden. 583 der untersuchten Gene wurden durch hC0-C1f induziert, wohingegen nur 344 der Gene durch C0-L induziert wurden. Insgesamt wurden lediglich 58 Gene sowohl durch hC0-C1f als auch C0-L induziert. 650 der untersuchten Gene wurden durch hC0-C1f herunterreguliert und 309 der untersuchten Gene wurden durch C0-L herunterreguliert; 82 dieser Gene überschritten sich.

hC0-C1f induzierte vor allem Chemokine (*CXCL-1*, *CXCL-2*, *CXCL-8*, *CCL-2*, *CCL-7*), *Interleukin 4 induced 1*, *MMP-9* sowie *ICAM-1* (Abbildung 25). *IL-32* sowie *BIRC3* wurden ebenfalls durch hC0-C1f induziert. *FIGF* (synonym *VEGF-D*) wurde hingegen durch hC0-C1f inhibiert. C0-L zeigte vor allem eine Induktion des Chemokins *CXCL-1* sowie des *Interleukin 34*. Die durch hC0-C1f sowie C0-L induzierten sowie supprimierten Gene sind in Abbildung 25 dargestellt.

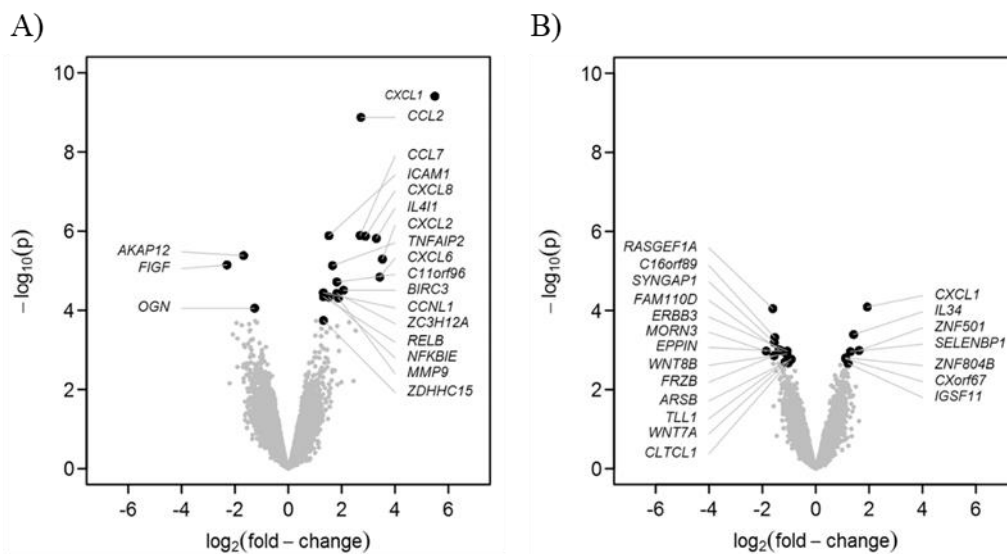


Abbildung 25: Volcano-Plot der durch (A) hC0-C1f und (B) C0-L beeinflussten Gene mit zusätzlicher Markierung der 20 am stärksten beeinflussten Gene. Die humanen Fibroblasten wurden respektiv für 24 Stunden mit dem jeweiligen Peptid stimuliert (je  $n = 3$ ), [157].

Zur Validierung der Microarray Ergebnisse wurde die mRNA-Menge von *CXCL-1*, *CCL-2*, *ICAM-1* sowie *MMP-9* nach 24-stündiger Stimulation mit hC0-C1f, LPS, C0-L sowie TGF- $\beta$  mittels RT-qPCR quantifiziert (Abbildung 26).

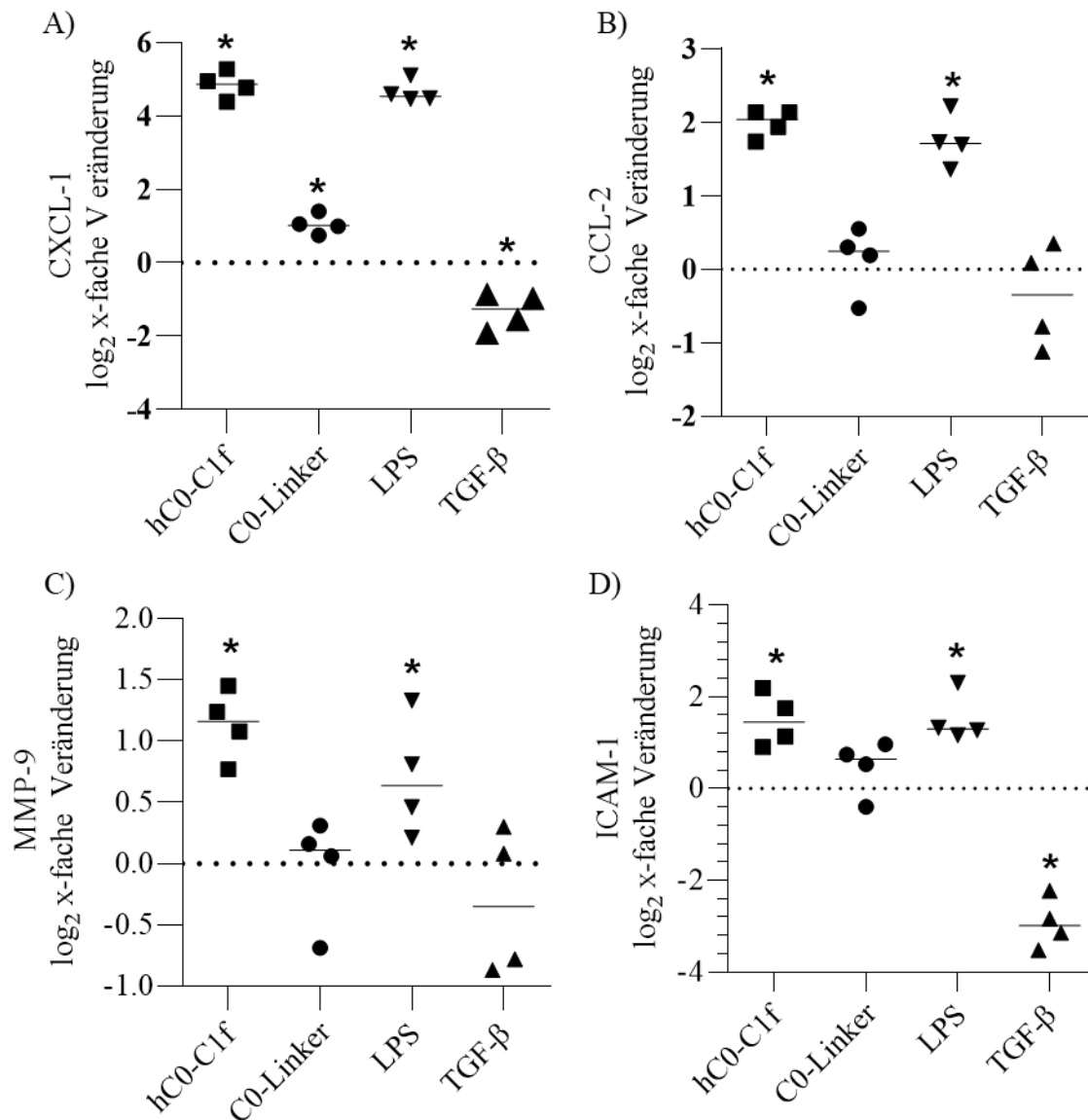


Abbildung 26: Aktivierung von humanen Fibroblasten nach 24-stündiger Stimulation mit hC0-C1f, C0-L, LPS sowie TGF-β. (A) CXCL-1, (B) CCL-2, (C) MMP-9 und (D) ICAM-1. \* = statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ), [157].

Analog zu den Microarray Ergebnissen zeigte sich eine signifikante Induktion von *CXCL-1* ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $4,8 \pm 0,4$ ,  $p < 0,001$ ), *CCL-2* ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $2,0 \pm 0,2$ ,  $p < 0,001$ ), *MMP-9* ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $1,1 \pm 0,3$ ,  $p < 0,001$ ) sowie *ICAM-1* ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $1,5 \pm 0,6$ ,  $p < 0,001$ ) durch hC0-C1f. LPS führte ebenfalls zu einer signifikanten Induktion von *CXCL-1* ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $4,7 \pm 0,3$ ,  $p < 0,001$ ), *CCL-2* ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $1,8 \pm 0,4$ ,  $p < 0,001$ ), *MMP-9* ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $0,7 \pm 0,5$ ,  $p = 0,011$ ) und *ICAM-1* ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $1,5 \pm 0,5$ ,  $p < 0,001$ ). Stimulation mit C0-L induzierte lediglich *CXCL-1* ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $1,0 \pm 0,3$ ,  $p < 0,001$ ), wohingegen TGF-β zu keiner signifikanten Induktion

dieser Gene nach 24-stündiger Stimulation führte (Abbildung 26). Vielmehr führte TGF- $\beta$  zu einer potenten Suppression dieser Gene ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $-1,3 \pm 0,5$ ,  $p < 0,001$  (*CXCL-1*),  $-0,4 \pm 0,7$ ,  $p = 0,142$  (*CCL-2*),  $-0,3 \pm 0,6$ ,  $p = 0,198$  (*MMP-9*),  $-2,9 \pm 0,5$ ,  $p < 0,001$  (*ICAM-1*)).

Zusätzlich wurde der zeitliche Verlauf der Expression von Chemokinen (*CXCL-1*, *CCL-2*), Zytokinen (*IL-1 $\beta$* , *IL-32*) sowie *MMP-9* nach vier-, sechs-, zwölf-, 24- und 48-stündiger Stimulation analysiert (Abbildung 27).

hC0-C1f induzierte bereits nach vierstündiger Stimulation die Chemokin-Genexpression ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $3,6 \pm 0,5$ ,  $p < 0,001$  (*CXCL-1*),  $2,6 \pm 0,2$ ,  $p < 0,001$  (*CCL-2*)). Die maximale Induktion von *CXCL-1* bzw. *CCL-2* war jeweils nach sechsstündiger Stimulation zu beobachten ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $5,1 \pm 0,3$ ,  $p < 0,001$  (*CXCL-1*),  $2,8 \pm 0,6$ ,  $p < 0,001$  (*CCL-2*)). Eine ähnliche Freisetzungskinetik war nach Stimulation mit LPS beobachtbar (Abbildung 27). C0-L sowie TGF- $\beta$  zeigten eine leichte Induktion der Chemokine, jedoch nahm die Stärke der Induktion bei längerer Stimulationsdauer ab (Abbildung 27).

*IL-1 $\beta$*  wurde bereits nach sechsstündiger Stimulation mit hC0-C1f maximal induziert ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $1,6 \pm 0,6$ ,  $p < 0,001$ ). Nach zwölfstündiger Stimulation war weiterhin eine Induktion beobachtbar, welche bei 24-stündiger Stimulation wieder absank ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $1,4 \pm 0,4$ ,  $p < 0,001$  (12h),  $0,8 \pm 0,6$ ,  $p = 0,023$  (24h)). Zum 48-stündigen Zeitpunkt zeigte sich ein zweiter Anstieg der *IL-1 $\beta$*  mRNA ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $1,9 \pm 0,3$ ,  $p < 0,001$ ). LPS und C0-L zeigten einen ähnlichen Verlauf (Abbildung 27). TGF- $\beta$  hingegen suppressierte die *IL-1 $\beta$*  mRNA Abundanz nach zwölf-, 24- sowie 48-stündiger Stimulation signifikant ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $-1,1 \pm 0,6$ ,  $p = 0,005$  (12h),  $-3,3 \pm 0,4$ ,  $p < 0,001$  (24h),  $-3,2 \pm 0,5$ ,  $p < 0,001$  (48h)).

hC0-C1f und LPS zeigten einen ähnlichen *IL-32* mRNA Induktionsverlauf mit einer signifikanten Induktion von *IL-32* nach 24- bzw. 48-stündiger Stimulation ( $\log_2$  x-fache Veränderung nach 24 Stunden:  $2,2 \pm 0,3$ ,  $p < 0,001$  (hC0-C1f),  $1,7 \pm 0,6$ ,  $p = 0,003$  (LPS) bzw. nach 48h:  $2,4 \pm 0,3$ ,  $p < 0,001$  (hC0-C1f),  $2,1 \pm 0,3$ ,  $p < 0,001$  (LPS)). Interessanterweise wurde *IL-32* nach 48-stündiger Stimulation mit TGF- $\beta$  ebenfalls deutlich induziert ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $2,6 \pm 0,3$ ,  $p < 0,001$ , Abbildung 27).

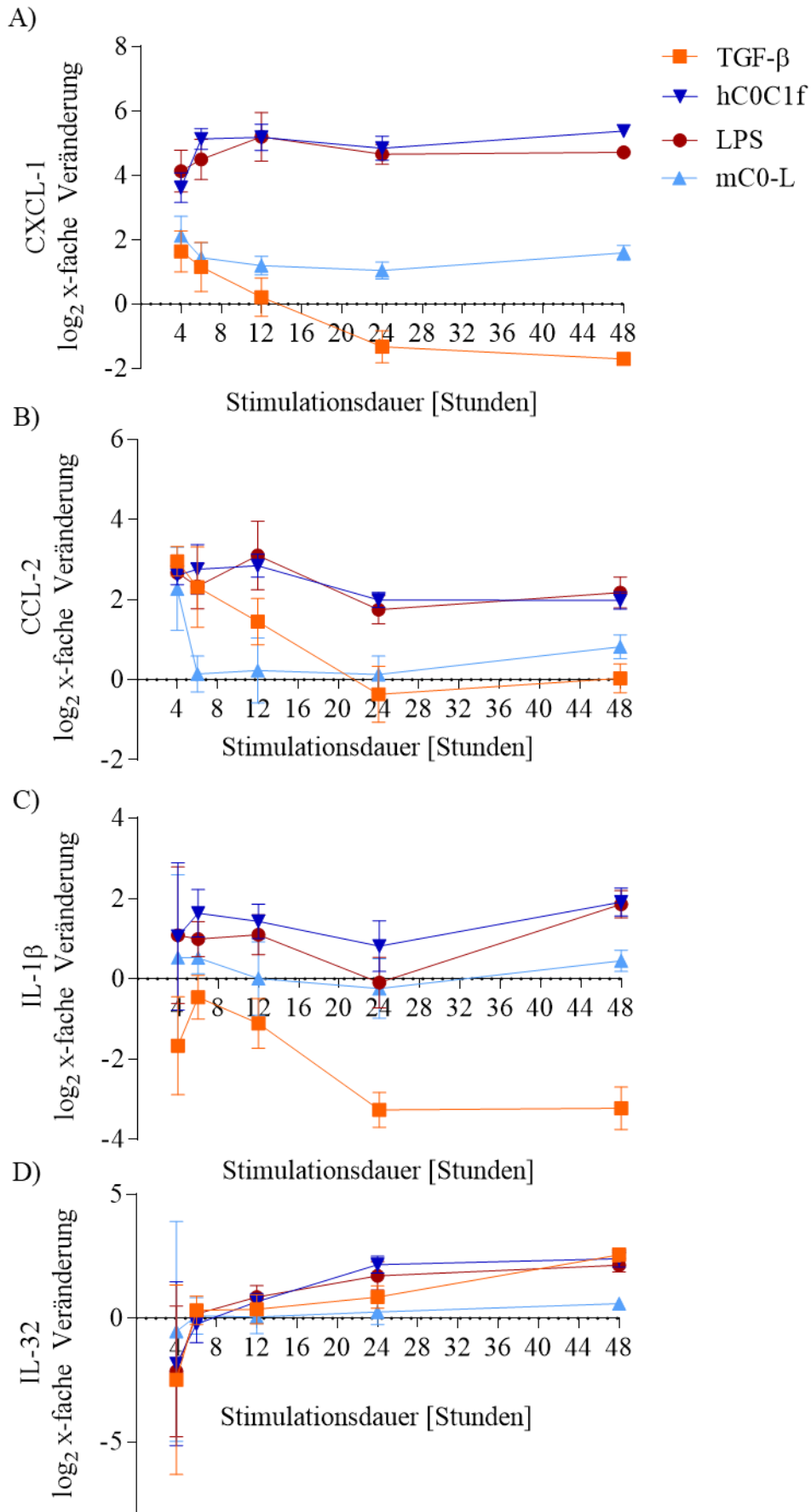


Abbildung 27. Zeitlicher Verlauf der Chemokin- und Zytokin-mRNA Beeinflussung nach Stimulation von humanen Fibroblasten mit TGF- $\beta$ , hC0-C1f, LPS und C0-L für vier, sechs, zwölf, 24 sowie 48 Stunden. Bereits nach kurzen Stimulationsdauern mit hC0-C1f erfolgte eine Induktion der Chemokine. Jeweils  $n = 4$ ,  $n = 3$  für IL-32 mRNA Abundanz nach LPS und hC0-C1f Stimulation für vier Stunden, modifiziert nach [157].

hC0-C1f induzierte bereits nach vierstündiger Stimulation die *MMP-9* mRNA ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $0,3 \pm 0,2$ ,  $p = 0,040$ ). Die *MMP-9* mRNA Abundanz stieg mit steigender Stimulationsdauer kontinuierlich an und zeigte nach 48-stündiger Stimulation ihr Maximum ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $1,8 \pm 0,2$ ,  $p < 0,001$ ). Die Kinetik von LPS ähnelte der von hC0-C1f und erreichte folglich nach 48-stündiger Stimulation ihr Maximum ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $1,5 \pm 0,1$ ,  $p < 0,001$ ). TGF- $\beta$  induzierte nach 48-stündiger Stimulation ebenfalls die *MMP-9* mRNA ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $1,4 \pm 0,2$ ,  $p < 0,001$ ), wohingegen C0-L zu keinem Zeitpunkt eine wesentliche Induktion von *MMP-9* zeigte (Abbildung 28).

Zusätzliche wurde der Einfluss der Stimulanzen auf die Expression des *TLR2* evaluiert. hC0-C1f führte nach sechsstündiger Stimulation zu einer signifikanten Induktion des *TLR2* ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $0,4 \pm 0,2$ ,  $p = 0,005$ ); weitere Zeitpunkte sind in Abbildung 28 dargestellt. LPS und C0-L zeigten einen analogen Verlauf (Abbildung 28). Interessanterweise zeigte TGF- $\beta$  ab einer sechsstündigen Stimulation eine signifikante Unterdrückung der Genexpression des *TLR2* ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $-1,1 \pm 0,3$ ,  $p < 0,001$ ) mit der maximalen Suppression nach 24 Stunden ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $-3,6 \pm 0,4$ ,  $p < 0,001$ ).



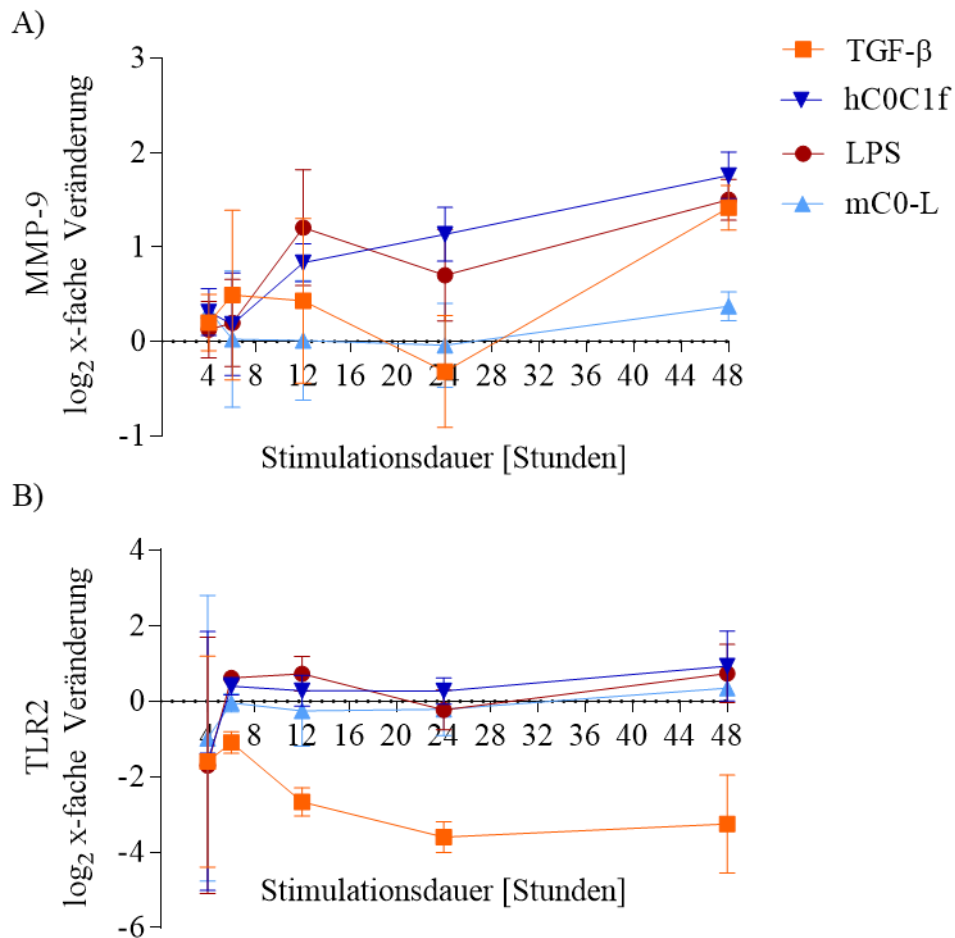


Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf der MMP-9 und TLR2 mRNA Beeinflussung nach Stimulation von humanen Fibroblasten mit TGF- $\beta$ , hC0-C1f, LPS und C0-L für vier, sechs, zwölf, 24 sowie 48 Stunden. Jeweils  $n = 4$ , modifiziert nach [157].

Zusammenfassend führte die Stimulation mit hC0-C1f ähnlich der Stimulation mit LPS zu einer Induktion von Chemokinen, *IL-32* sowie *MMP-9*. Die Behandlung mit C0-L und TGF- $\beta$  hingegen führte zu keiner relevanten inflammatorischen Antwort der Fibroblasten.

### Einfluss von hC0-C1f auf humane Fibroblasten: Immunhistochemie

Mittels immunhistochemischer Färbungen von  $\alpha$ SMA wurde der Einfluss von hC0-C1f, LPS, TGF- $\beta$  und C0-L auf die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten überprüft. Hierfür wurden die Fibroblasten jeweils für 48 Stunden mit dem jeweiligen Peptid inkubiert. Repräsentative Aufnahmen sind in Abbildung 29 gezeigt.

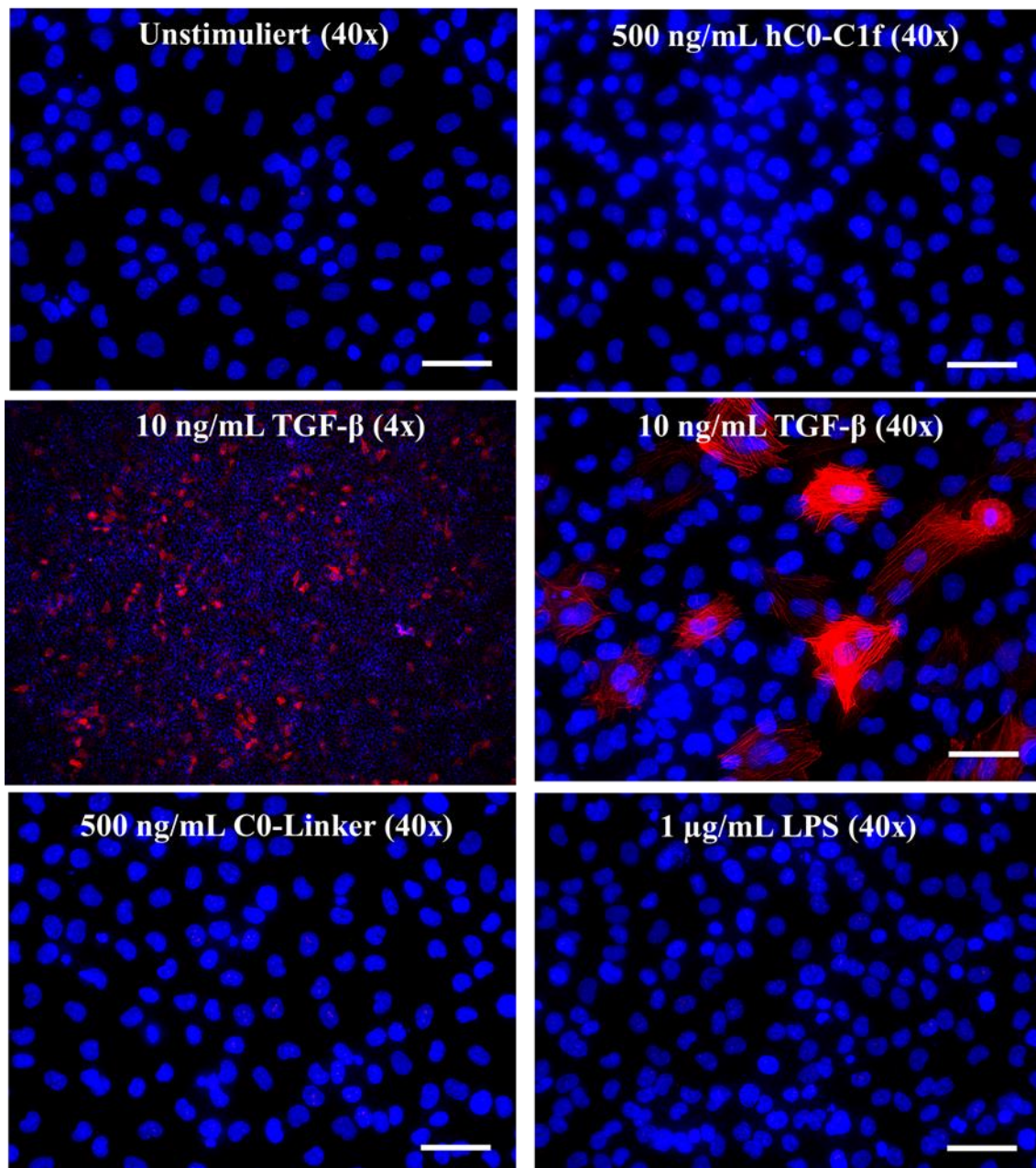


Abbildung 29: Immunhistochemische Färbung von  $\alpha$ SMA (rot) nach 48-stündiger Stimulation der humanen Fibroblasten (vierfache bzw. 40-fache Vergrößerung, Maßstabsleiste = 50  $\mu$ m). Nuklei wurden blau dargestellt, modifiziert nach [157].

Es wurden jeweils mehrere unabhängige Bildausschnitte (4x Vergrößerung) ausgezählt, um so den Einfluss der Peptide auf die intrazelluläre  $\alpha$ SMA Expression zu evaluieren.

In der unstimulierten Kontrolle zeigte die Färbung, dass  $0,07 \pm 0,03$  % der Zellen  $\alpha$ SMA positiv sind. Die Stimulation mit TGF- $\beta$  führte zu einer vermehrten Expression des intrazellulären  $\alpha$ SMA ( $19,75 \pm 5,75$  % der Zellen  $\alpha$ SMA positiv,  $p < 0,001$ ). Das intrazelluläre  $\alpha$ SMA war nach Stimulation mit TGF- $\beta$  fibrillenartig strukturiert

(Abbildung 29). hC0-C1f, C0-L und LPS beeinflussten weder das Expressionsniveau noch die Struktur des intrazellulär vorkommenden  $\alpha$ SMA ( $0,15 \pm 0,08$  %  $\alpha$ SMA positiv,  $p = 0,309$  (hC0-C1f),  $0,23 \pm 0,05$  %  $\alpha$ SMA positiv,  $p = 0,043$  (C0-L),  $0,13 \pm 0,02$  %  $\alpha$ SMA positiv,  $p = 0,029$  (LPS)).

Die Induktion von  $\alpha$ SMA auf Proteinebene wurde zusätzlich mittels Western Blots evaluiert. Es zeigte sich, dass TGF- $\beta$  zu einer Hochregulation des intrazellulären  $\alpha$ SMA führte (Abbildung 30). hC0-C1f und LPS führten analog zu den RT-qPCR Ergebnissen zu keiner Induktion des  $\alpha$ SMA (log<sub>2</sub> x-fache Veränderung:  $-0,4 \pm 0,3$ ,  $p = 0,063$  (hC0-C1f),  $-0,2 \pm 0,4$ ,  $p = 0,280$  (LPS),  $2,0 \pm 0,6$ ,  $p < 0,001$  (TGF- $\beta$ )).

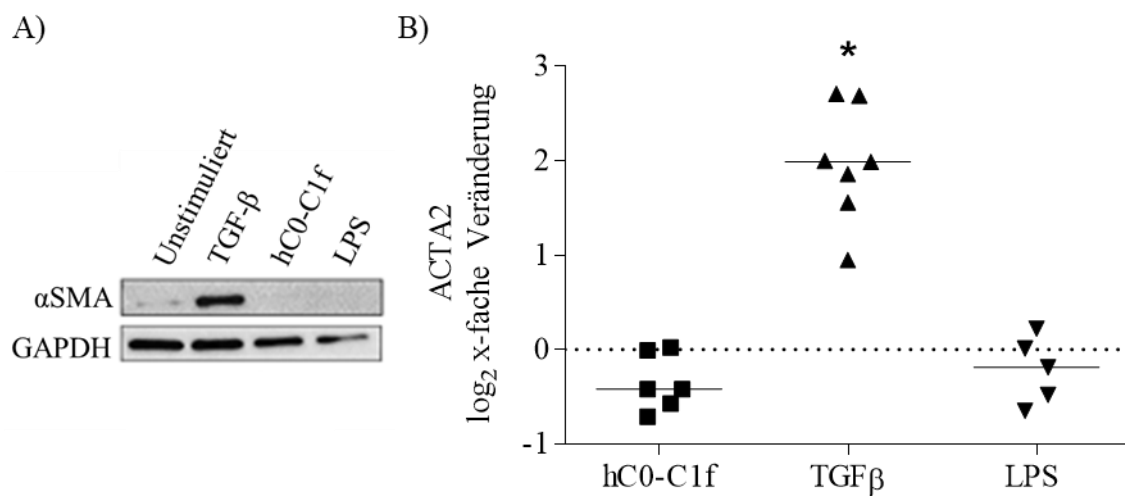


Abbildung 30: Beeinflussung von ACTA2/ $\alpha$ SMA nach 48-stündiger Stimulation mit hC0-C1f, TGF- $\beta$  und LPS. TGF- $\beta$  induzierte ACTA2/ $\alpha$ SMA auf Gen- sowie Proteinebene. hC0-C1f und LPS zeigten keine Induktion von ACTA2/ $\alpha$ SMA. \* = statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

Interessanterweise gab es auf Proteinebene eine Induktion von Kollagen durch hC0-C1f (Abbildung 31). Es zeigten sich zwei Banden in Western Blots, wobei eine über 170 kDa und eine unter 170 kDa lag (Repräsentative Aufnahme in Abbildung 31)

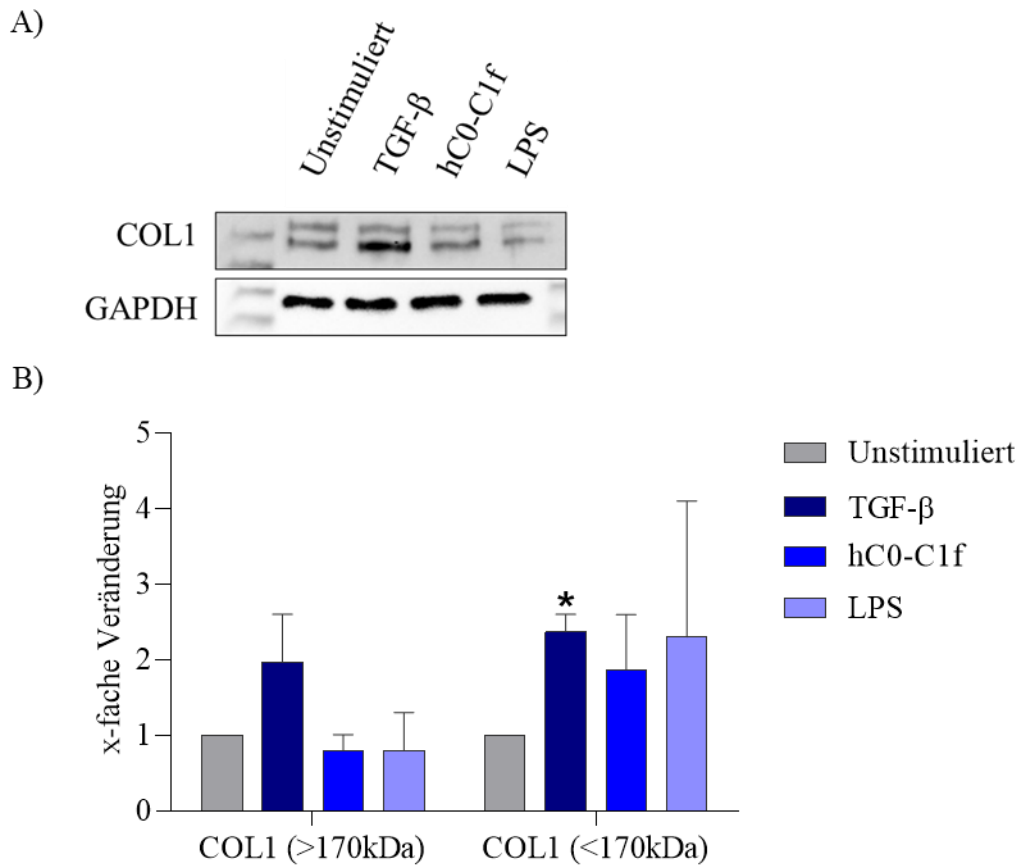


Abbildung 31: (A) Repräsentativer Western Blot für COL1 sowie (B) Quantifikation der Western Blots. Es zeigten sich zwei Banden im Western Blot. Nach Quantifikation zeigte sich, dass die größere Isoform (> 170 kDa) durch TGF- $\beta$  tendenziell induziert wurde. hC0-C1f und LPS zeigten keine Beeinflussung dieser Isoform. Die kleinere Isoform (< 170 kDa) hingegen wurde signifikant durch TGF- $\beta$  und tendenziell durch hC0-C1f und LPS induziert. \* = statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

Es zeigten sich wesentliche Unterschiede zwischen der größeren und kleineren COL1 Variante. Die größere Variante wurde lediglich durch TGF- $\beta$  induziert, wohingegen hC0-C1f und LPS keinen Einfluss auf dieses Protein hatten (x-fache Veränderung:  $2,0 \pm 1,1$ ,  $p = 0,203$  (TGF- $\beta$ ),  $0,8 \pm 0,4$ ,  $p = 0,391$  (hC0-C1f),  $0,8 \pm 0,9$ ,  $p = 0,711$  (LPS), je  $n = 3$ ). Die kleinere Variante des COL1 wurde jedoch durch hC0-C1f sowie TGF- $\beta$  und LPS tendenziell hochreguliert (x-fache Veränderung:  $1,9 \pm 1,3$ ,  $p = 0,301$  (hC0-C1f),  $2,4 \pm 0,4$ ,  $p = 0,004$  (TGF- $\beta$ ),  $2,3 \pm 3,1$ ,  $p = 0,510$  (LPS), je  $n = 3$ ).

#### Einfluss von Endotoxinen auf die beobachteten Effekte des C0-C1f

Es ist bekannt, dass die Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli* zu einer Kontamination mit Endotoxinen führen kann [130]. In der Tat können die hierdurch erreichten Konzentrationen an Endotoxinen ausreichend sein, um Zellen wie

beispielsweise Makrophagen zu aktivieren [130]. Daher wurde überprüft, ob eine mögliche Kontamination der Peptide mit Endotoxinen einen Einfluss auf die durch C0-C1f induzierten Effekte in Fibroblasten hat. Hierfür wurde hC0-C1f in *ClearColi* – eine Zelllinie, in denen die störenden Endotoxin-vermittelten Effekte genetisch deaktiviert wurden, so dass keine artifizielle NFκB Aktivierung möglich ist – produziert [91, 111]. Zudem wurde hC0-C1f mit Polymyxin B sowie Proteinase K behandelt. Genexpressionsanalysen zeigten, dass *CXCL-1*, *CCL-2*, *MMP-9* sowie *ICAM-1* durch hC0-C1f, welches in *ClearColi* produziert wurde, induziert wurden (Abbildung 32). Die Induktion war vergleichbar mit der Induktion durch C0-C1f produziert in BL21 (DE3) (Abbildung 32, vergleiche Abbildung 26). Polymyxin B, welches Endotoxine inhibiert, führte zu keiner wesentlichen Verminderung der *CXCL-1*, *CCL-2*, *MMP-9* sowie *ICAM-1* Induktion durch hC0-C1f, wohingegen der Proteinverdau mittels Proteinase K die Effekte des hC0-C1f deutlich inhibierte (Abbildung 32).

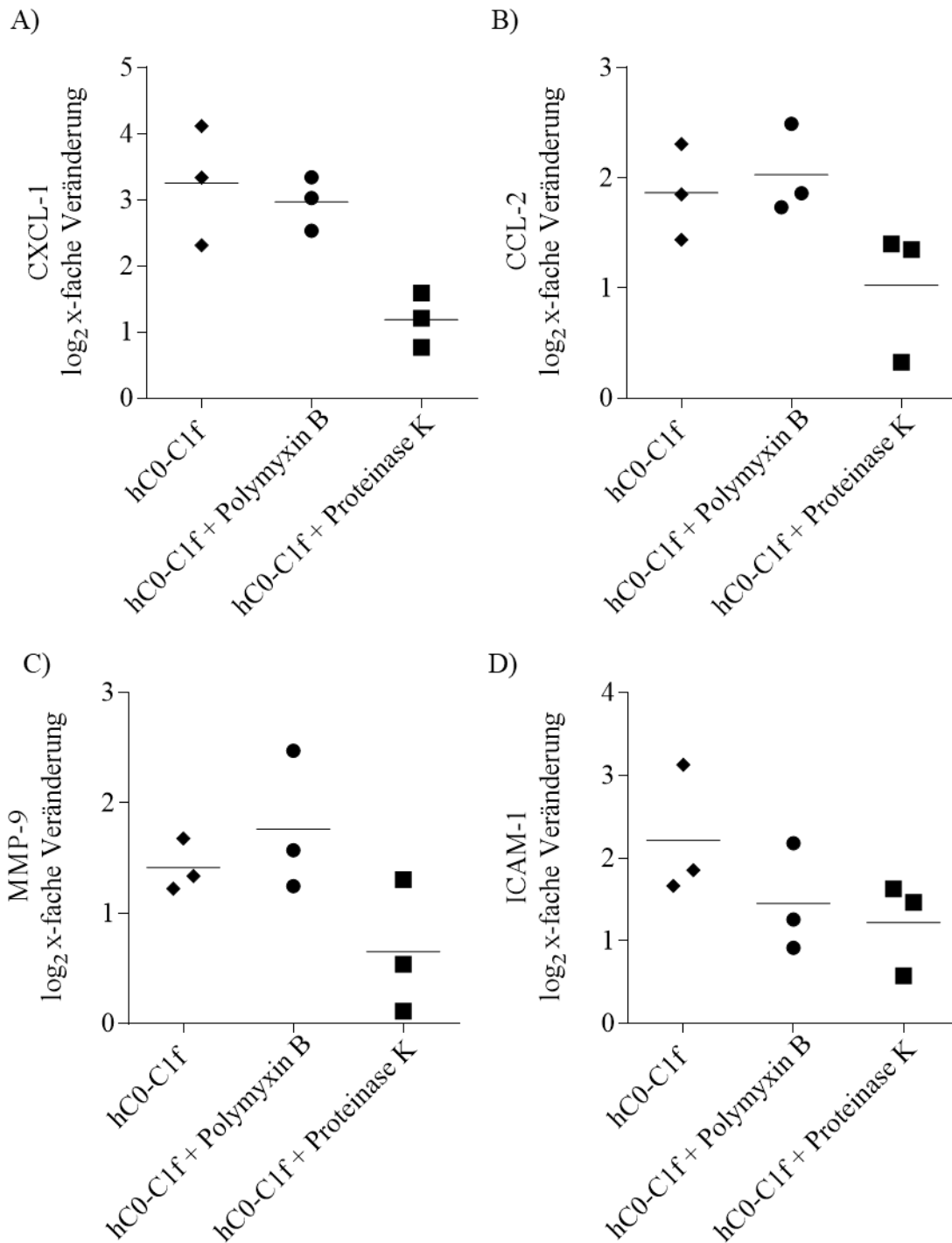


Abbildung 32: Einfluss von Endotoxinen auf die hC0-C1f vermittelte Induktion von Chemokinen, MMP-9 sowie ICAM-1. Es wurde in ClearColi produziertes hC0-C1f verwendet.

### 3.2.4 Wechselseitiger Einfluss von C0-C1f und TGF- $\beta$ in humanen Fibroblasten

Da insbesondere TGF- $\beta$  die Fibrose nach einem Myokardinfarkt vorantreibt, wurden Versuche durchgeführt, um den wechselseitigen Einfluss von hC0-C1f und TGF- $\beta$  zu untersuchen. Hierfür wurden die Fibroblasten gleichzeitig mit TGF- $\beta$  und hC0-C1f

behandelt. Im Microarray zeigte sich, dass bei gleichzeitiger Stimulation weiterhin *MMPs*, *IL-32* ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $2,6 \pm 0,8$ ,  $p < 0,001$ ) sowie *CCLs* (*CCL-2* ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $1,6 \pm 0,4$ ,  $p < 0,001$ ), *CCL-7* ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $1,5 \pm 0,7$ ,  $p < 0,001$ )) induziert wurden.

Am stärksten wurden *COMP* ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $7,0 \pm 1,2$ ,  $p < 0,001$ ), *PII6* ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $7,0 \pm 0,9$ ,  $p < 0,001$ ), *IL-11* ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $5,8 \pm 0,7$ ,  $p < 0,001$ ) sowie *MMPs* (Tabelle 13) nach der Ko-Stimulation mit TGF- $\beta$  und hC0-C1f induziert. *NPTX1* ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $-5,6 \pm 0,8$ ,  $p < 0,001$ ), *ANKRD33B* ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $-5,2 \pm 0,5$ ,  $p < 0,001$ ) sowie *SECTM1* ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $-4,7 \pm 0,8$ ,  $p < 0,001$ ) wurden am stärksten durch die Ko-Stimulation inhibiert.

<b>Gen</b>	<b><math>\log_2</math> x-fache Veränderung</b>
<i>Am stärksten induzierten Gene</i>	
<i>COMP</i>	$7,0 \pm 1,2$ , $p < 0,001$
<i>PII6</i>	$7,0 \pm 0,9$ , $p < 0,001$
<i>IL-11</i>	$5,8 \pm 0,7$ , $p < 0,001$
<i>MMP-1</i>	$4,1 \pm 1,6$ , $p < 0,001$
<i>MMP-2</i>	$0,9 \pm 0,6$ , $p = 0,003$
<i>MMP-3</i>	$5,3 \pm 1,0$ , $p < 0,001$
<i>MMP-9</i>	$1,8 \pm 0,7$ , $p < 0,001$
<i>MMP-13</i>	$5,5 \pm 0,7$ , $p < 0,001$
<i>Am stärksten supprimierten Gene</i>	
<i>NPTX1</i>	$-5,6 \pm 0,8$ , $p < 0,001$
<i>ANKRD33B</i>	$-5,2 \pm 0,5$ , $p < 0,001$
<i>SECTM1</i>	$-4,7 \pm 0,8$ , $p < 0,001$

Tabelle 13: Genregulation nach Ko-Stimulation mit TGF- $\beta$  und hC0-C1f.

hC0-C1f potenzierte die Herunterregulation der mRNA für den *TGF-β Rezeptor 3* durch TGF-β ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $-4,2 \pm 0,8$  (TGF-β + hC0-C1f) vs  $-3,0 \pm 0,8$  (TGF-β),  $p = 0,005$ ). Die Induktion der *MMP-1* mRNA war lediglich bei Ko-Stimulation mit TGF-β und hC0-C1f signifikant ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $4,1 \pm 1,6$ ,  $p < 0,001$ ). Die *MMP-3* mRNA Induktion wurde durch die Ko-Stimulation ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $5,3 \pm 1,0$ ,  $p < 0,001$ ) im Vergleich zur Einzelstimulation mit TGF-β ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $3,2 \pm 1,0$ ) signifikant potenziert ( $p < 0,001$ ). Die Ko-Stimulation beeinflusste zudem *FIGF*, da der Effekt von TGF-β ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $-3,2 \pm 0,7$ ,  $p < 0,001$ ) durch die gleichzeitige Präsenz von hC0-C1f tendenziell reduziert wurde ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $-2,7 \pm 0,71$ ,  $p < 0,001$  (Vergleich Ko-Stimulation und unstimuliert),  $p = 0,15$  (Vergleich Ko-Stimulation und TGF-β)).

Zwecks Validierung wurden RT-qPCR von Proben nach Ko-Stimulationen mit TGF-β und hC0-C1f durchgeführt. Der zeitliche Verlauf der Ko-Stimulation für die jeweiligen Gene (*CXCL-1*, *CCL-2*, *MMP-9*, *IL-32*) ist in Abbildung 33 dargestellt.

Die kombinierte Stimulation von hC0-C1f und TGF-β führte bereits nach vierstündiger Stimulation zu einer potenzierten Induktion von *CXCL-1* ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $5,4 \pm 0,2$ ,  $p < 0,001$ ) sowie nach sechsstündiger Stimulation zu einer potenzierten Induktion von *CCL-2* ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $5,2 \pm 1,3$ ,  $p < 0,001$ ). Die beobachtete Potenzierung der Effekte bei Ko-Stimulation war im Vergleich zu der alleinigen Stimulation mit hC0-C1f signifikant ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $3,6 \pm 0,5$  (hC0-C1f) vs  $5,2 \pm 0,2$  (Ko-Stimulation),  $p = 0,002$  (*CXCL-1*) bzw.  $2,8 \pm 0,6$  (hC0-C1f) vs  $5,2 \pm 1,3$  (Ko-Stimulation),  $p = 0,016$  (*CCL-2*)). Die Induktion dieser Chemokine hielt bis zu einer 12-stündigen Stimulation an; zu späteren Zeitpunkten war keine relevante Induktion der Chemokine beobachtbar (Abbildung 33).

Der Effekt von TGF-β bzw. hC0-C1f auf die *MMP-9* Genexpression potenzierte sich ebenfalls durch die Ko-Stimulation ( $\log_2$  x-fache Veränderung nach 12h:  $1,8 \pm 0,3$ ,  $p < 0,001$ ; im Vergleich zur Einzelstimulation mit hC0-C1f ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $0,8 \pm 0,3$ )  $p = 0,054$ , Abbildung 33).



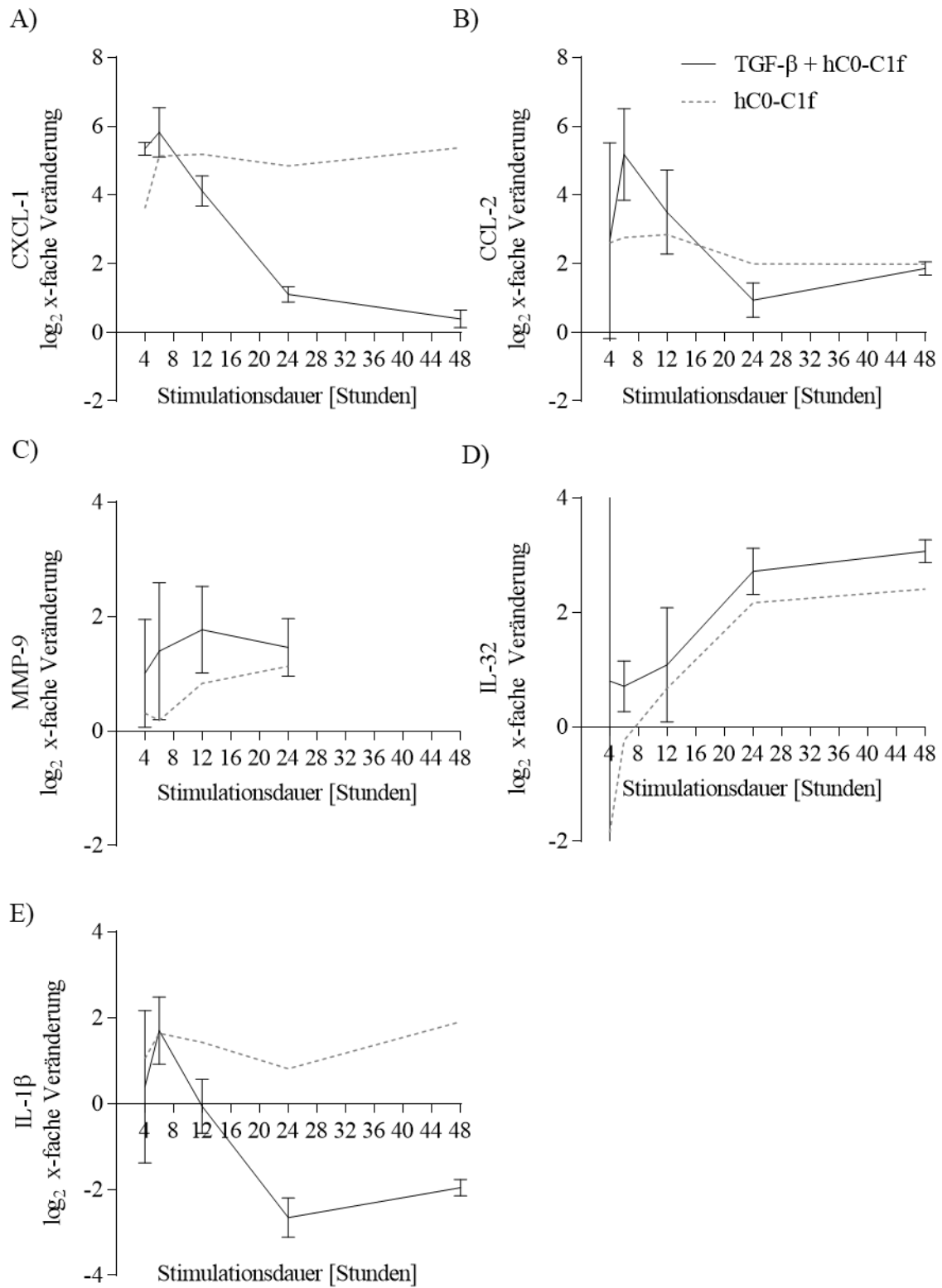


Abbildung 33: Zeitlicher Verlauf von (A) CXCL-1, (B) CCL-2, (C) MMP-9, (D) IL-32 und (E) IL-1 $\beta$  bei simultaner Stimulation der humanen Fibroblasten mit hC0-C1f und TGF- $\beta$ .

Bezüglich *IL-32* zeigte die Ko-Stimulation bereits nach sechsständiger Stimulation eine tendenzielle Aufhebung der initialen Herunterregulation der *IL-32* mRNA durch hC0-C1f ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $0,7 \pm 0,4$ ,  $p = 0,060$ ; im Vergleich zur Einzelstimulation mit hC0-C1f ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $-0,2 \pm 0,7$ )  $p = 0,072$ ). Bei 12-, 24- sowie 48-stündiger Ko-Stimulation zeigte sich eine Erhöhung der *IL-32* mRNA Abundanz im Vergleich zur Einzelstimulation mit hC0-C1f (maximale *IL-32*  $\log_2$  x-fache Veränderung nach 48h:  $3,1 \pm 0,2$ ,  $p < 0,001$ ; im Vergleich zur Einzelstimulation mit hC0-C1f ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $2,4 \pm 0,3$ )  $p = 0,017$ ).

Bei gleichzeitiger Stimulation mit TGF- $\beta$  und hC0-C1f wurde der Effekt des hC0-C1f auf die *IL-1 $\beta$*  mRNA Synthese nach 24- bzw. 48-stündiger Stimulation umgekehrt ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $-2,7 \pm 0,5$ ,  $p < 0,001$  (24h) bzw.  $-2,0 \pm 0,2$ ,  $p < 0,001$  (48h); im Vergleich zur Einzelstimulation mit hC0-C1f ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $0,8 \pm 0,6$  nach 24-stündiger bzw.  $1,9 \pm 0,3$  nach 48-stündiger Stimulation)  $p < 0,001$  (respektiv für 24-/48-stündige Stimulation)).

Die Ko-Stimulationsversuche zeigten im direkten Vergleich der fibrotischen Marker nach 24-stündiger Stimulation, dass die Kollagensynthese nicht wesentlich durch die Ko-Stimulation beeinflusst wurde (Abbildung 34). Die *ACTA2* Expression induziert durch TGF- $\beta$  wurde jedoch durch hC0-C1f tendenziell inhibiert ( $p = 0,133$ ).

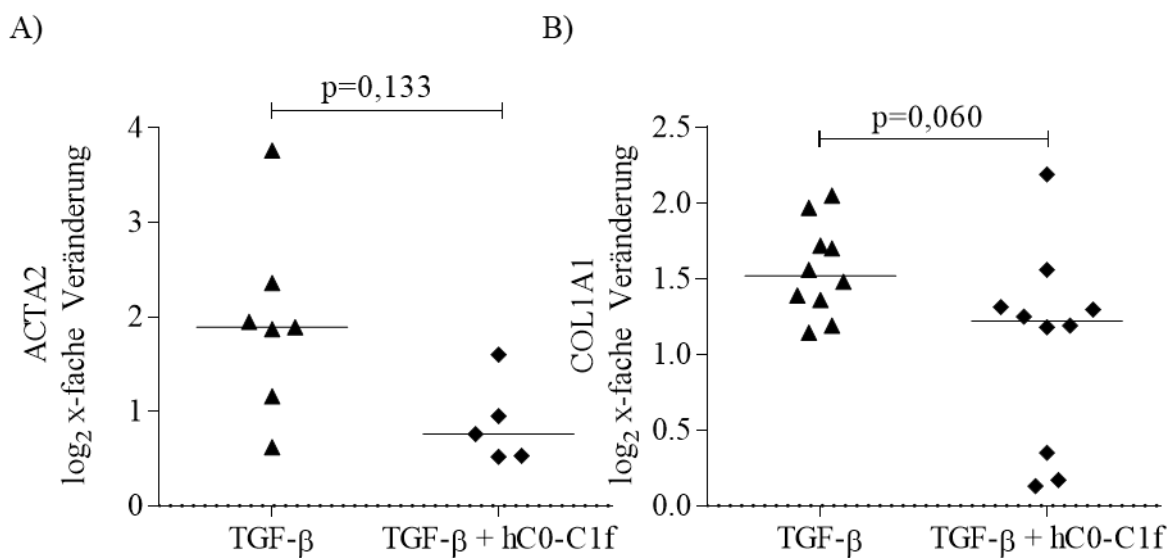


Abbildung 34: Einfluss der Ko-Stimulation mit TGF- $\beta$  und hC0-C1f auf *ACTA2* und *COL1A1*. Die 24-stündige Ko-Stimulation mit hC0-C1f und TGF- $\beta$  führte zu einer abgeschwächten Induktion von *ACTA2*.

Mittels immunhistochemischer Färbung von  $\alpha$ SMA wurde der Einfluss der Ko-Stimulation von hC0-C1f bzw. C0-L mit TGF- $\beta$  auf die Zellen überprüft. Hierfür wurden die Fibroblasten erneut für 48 Stunden mit TGF- $\beta$  und hC0-C1f oder TGF- $\beta$  und C0-L inkubiert.

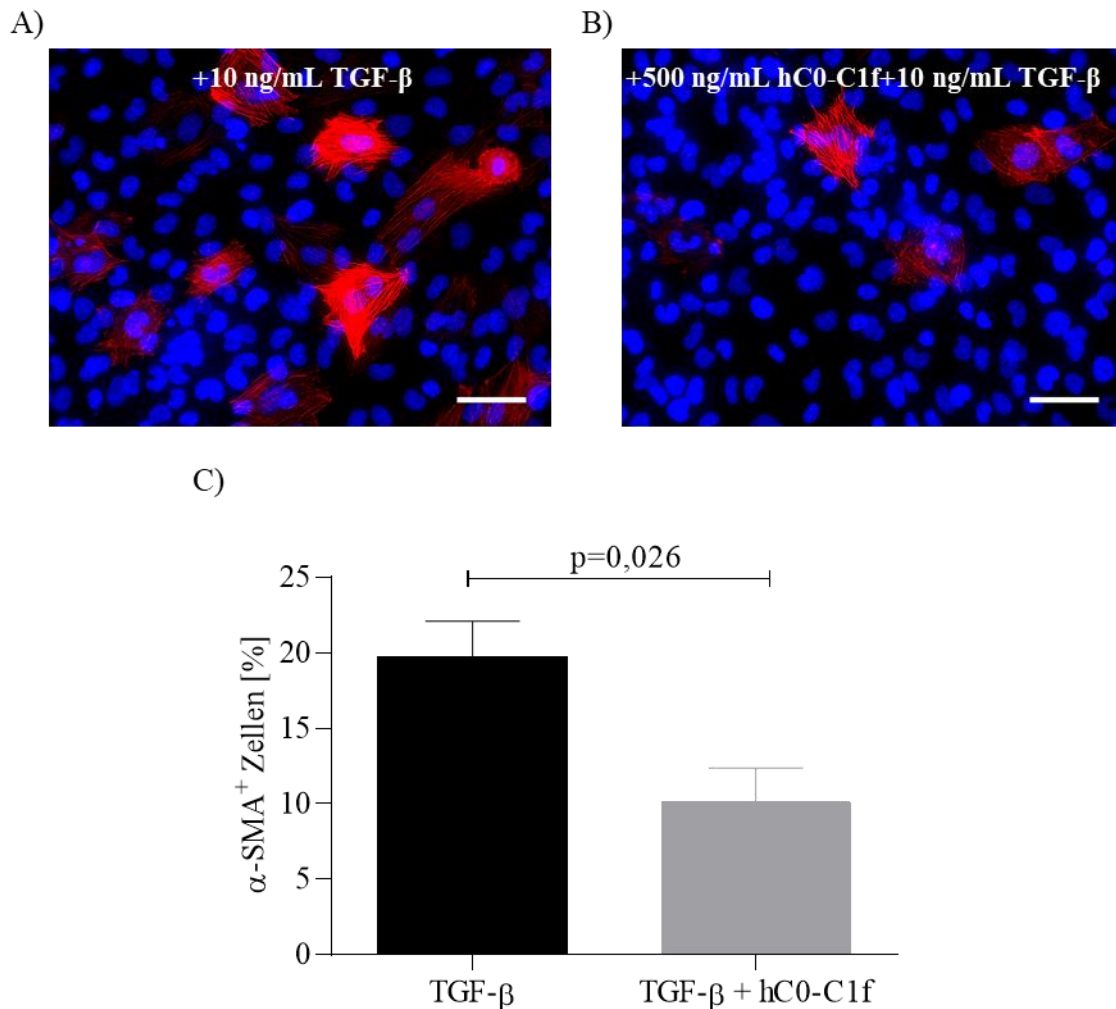


Abbildung 35: Repräsentative  $\alpha$ SMA Färbung nach 48-stündiger Stimulation der humanen Fibroblasten. (A) TGF- $\beta$ , 40-fache Vergrößerung (B) hC0-C1f + TGF- $\beta$ , 40-fache Vergrößerung (Maßstabsleiste = 50  $\mu$ m) (C) Auszählung von sechs (TGF- $\beta$ ) bzw. fünf (hC0-C1f + TGF- $\beta$ ) unabhängigen Bildausschnitten bei 4x Vergrößerung.

Die Kombination von hC0-C1f und TGF- $\beta$  führte zu einem verminderten Effekt von TGF- $\beta$  auf die Zellen (Ko-Stimulation:  $10,11 \pm 5,05$  %  $\alpha$ SMA positiv,  $p = 0,016$ ; im Vergleich zu  $\alpha$ SMA-positiven Zellen bei alleiniger TGF- $\beta$  Exposition  $p = 0,026$ ); die strukturellen Änderungen des  $\alpha$ SMA waren weiterhin nachweisbar. Die Kombination von C0-L mit TGF- $\beta$  führte hingegen zu keiner Verminderung des Effektes von TGF- $\beta$  auf die humanen Fibroblasten (Ko-Stimulation:  $21,44 \pm 1,02$  %  $\alpha$ SMA positiv,  $p = 0,001$ ).

Die initiale Unterdrückung der *TLR2*-Genexpression durch TGF- $\beta$  war in den Ko-Stimulationsversuchen weiterhin zu beobachten (Abbildung 36). Interessanterweise war nach 6-, 12-, 24- sowie 48-stündiger Stimulation eine deutliche Supprimierung der *TLR2* mRNA Abundanz beobachtbar (Abbildung 36). Die Supprimierung des *TLR2* war im Vergleich zur Einzelstimulation mit hC0-C1f bereits nach sechsständiger Stimulation deutlich verstärkt ( $\log_2$  x-fache Veränderung:  $0,4 \pm 0,2$  (hC0-C1f) vs  $-0,5 \pm 0,6$  (Ko-Stimulation),  $p = 0,028$ ).

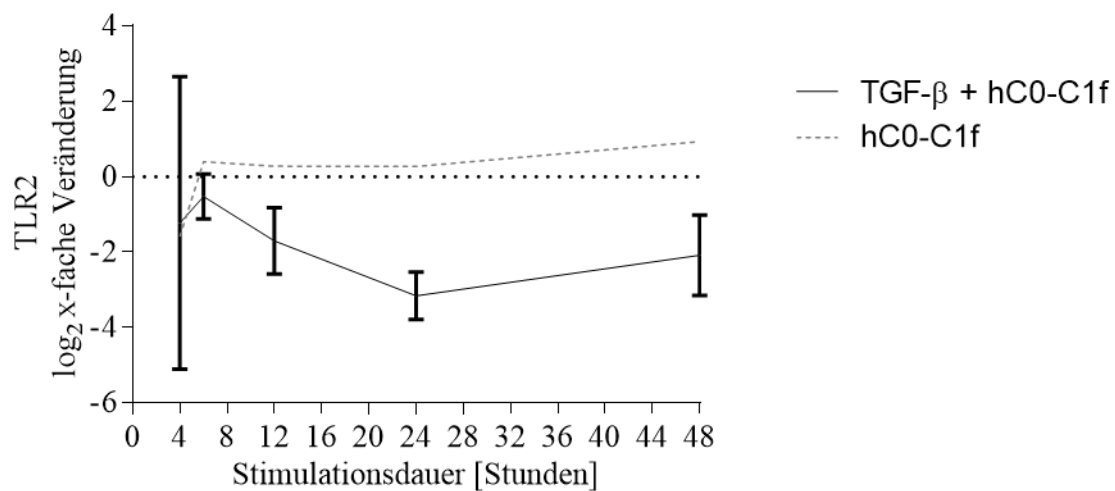


Abbildung 36: Einfluss der Ko-Stimulation mit hC0-C1f und TGF- $\beta$  auf die Expression des *TLR2* in humanen Fibroblasten.

### 3.2.5 Einfluss von C0-C1f auf Signalwege in Fibroblasten

Um die durch C0-C1f beeinflussten Signalwege zu analysieren, wurde zunächst eine KEGG Analyse anhand der Microarray Daten durchgeführt (Abbildung 37). Nach Stimulation mit hC0-C1f wurde in den Fibroblasten insbesondere der TGF- $\beta$  sowie der NF $\kappa$ B-Signalweg beeinflusst.

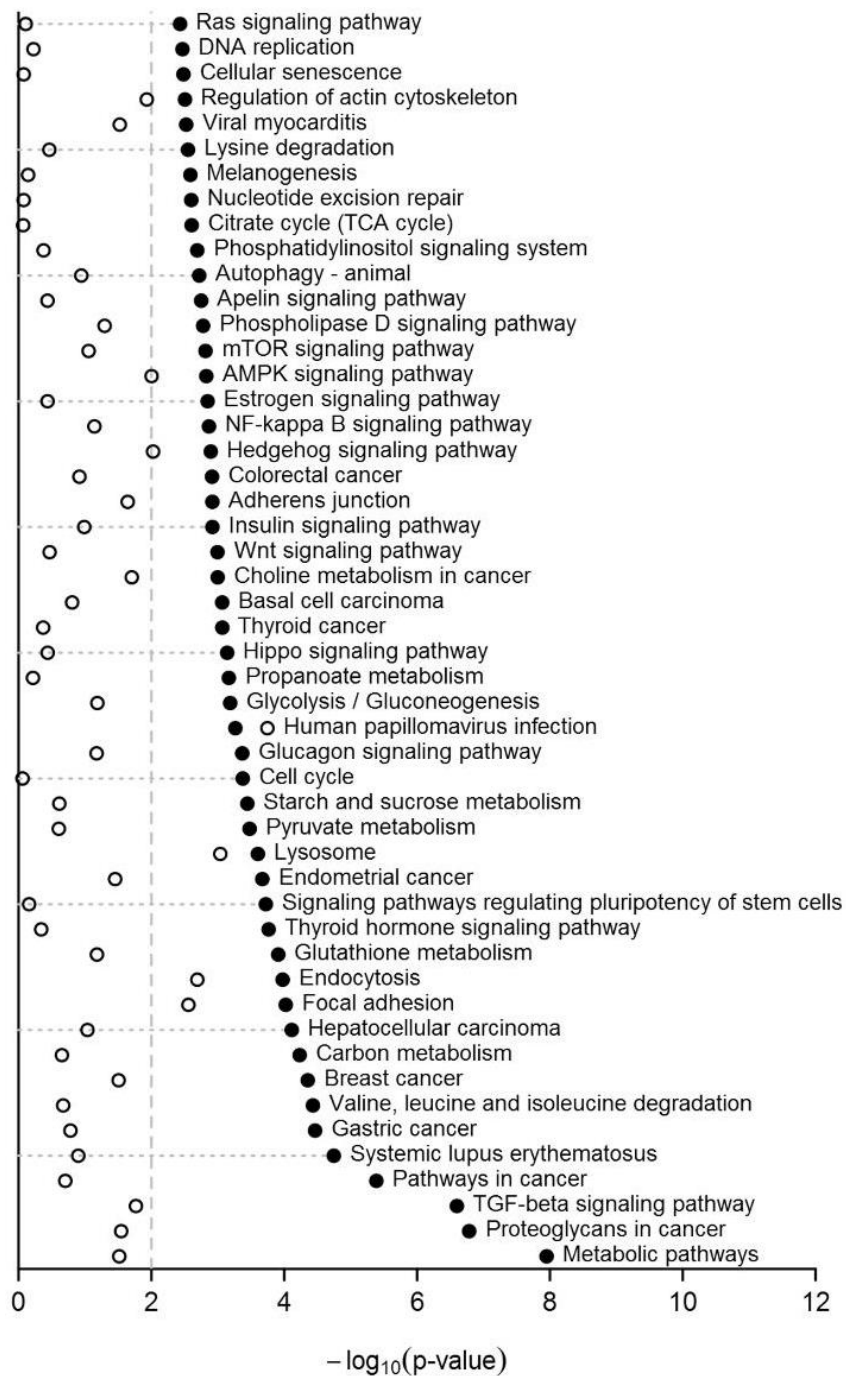


Abbildung 37: Einfluss von hC0-C1f auf verschiedene Signalwege in Fibroblasten (KEGG Analyse), [157].

Tieferegreifende Analysen zeigten, dass innerhalb des NF $\kappa$ B Signalweges *IL-1B* sowie *TNFSF1* induziert wurden. Hierdurch kam es unter anderem zu einer Induktion von *TRAF2* sowie *NFKB1*, was die zuvor beobachtete Induktion von *BIRC3*, *IL1B*, *CXCL2* sowie *ICAM1* auslöst (Abbildung 38).

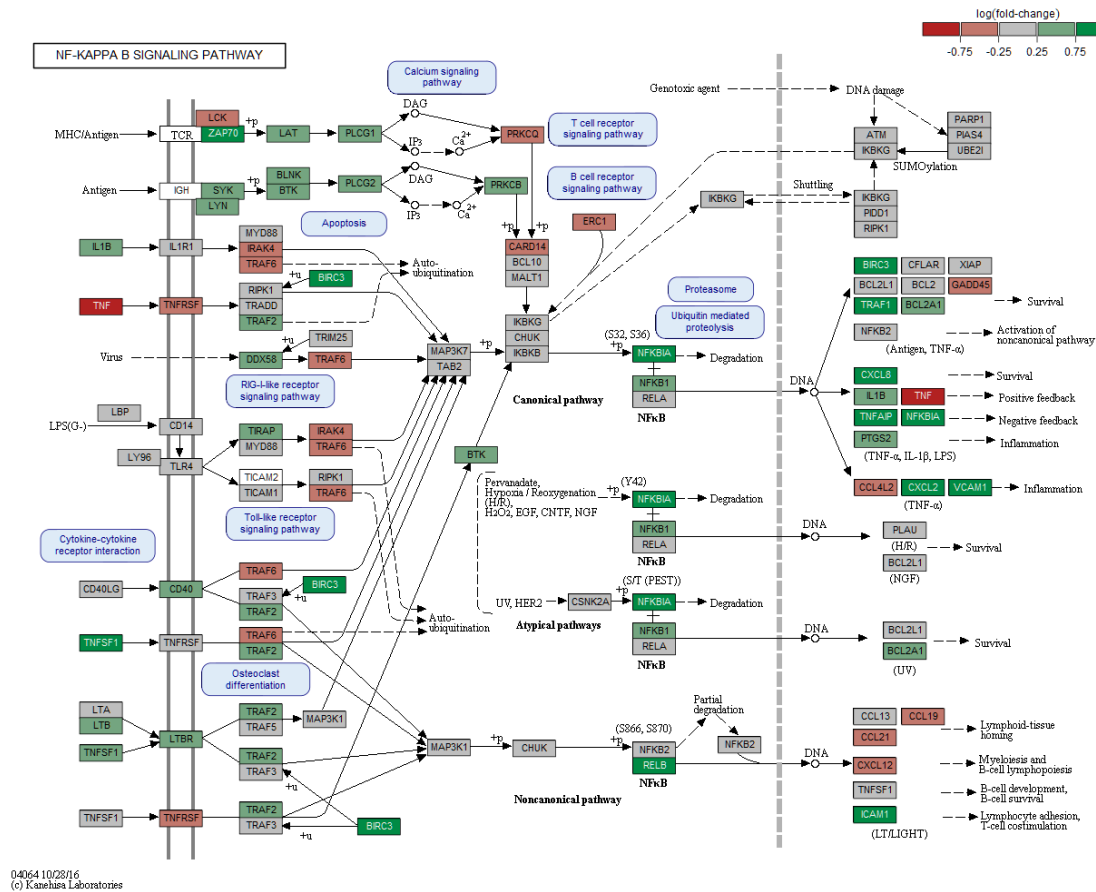


Abbildung 38: Aufschlüsselung der Beeinflussung des NF $\kappa$ B Signalweges durch hCO-C1f (KEGG Analyse).

Analog zeigte sich beim TGF- $\beta$  Signalweg, dass hCO-C1f zu einer Herunterregulation von *BMPR2*, *BMPR1B* sowie *ACVR1B/C* führte (Abbildung 39). Hierdurch wurde eine Supprimierung von *SMAD3/4/5* induziert (Abbildung 39). Es zeigte sich außerdem eine starke Reduktion der *SMAD7* Genexpression (Abbildung 39).

### 3. Ergebnisse

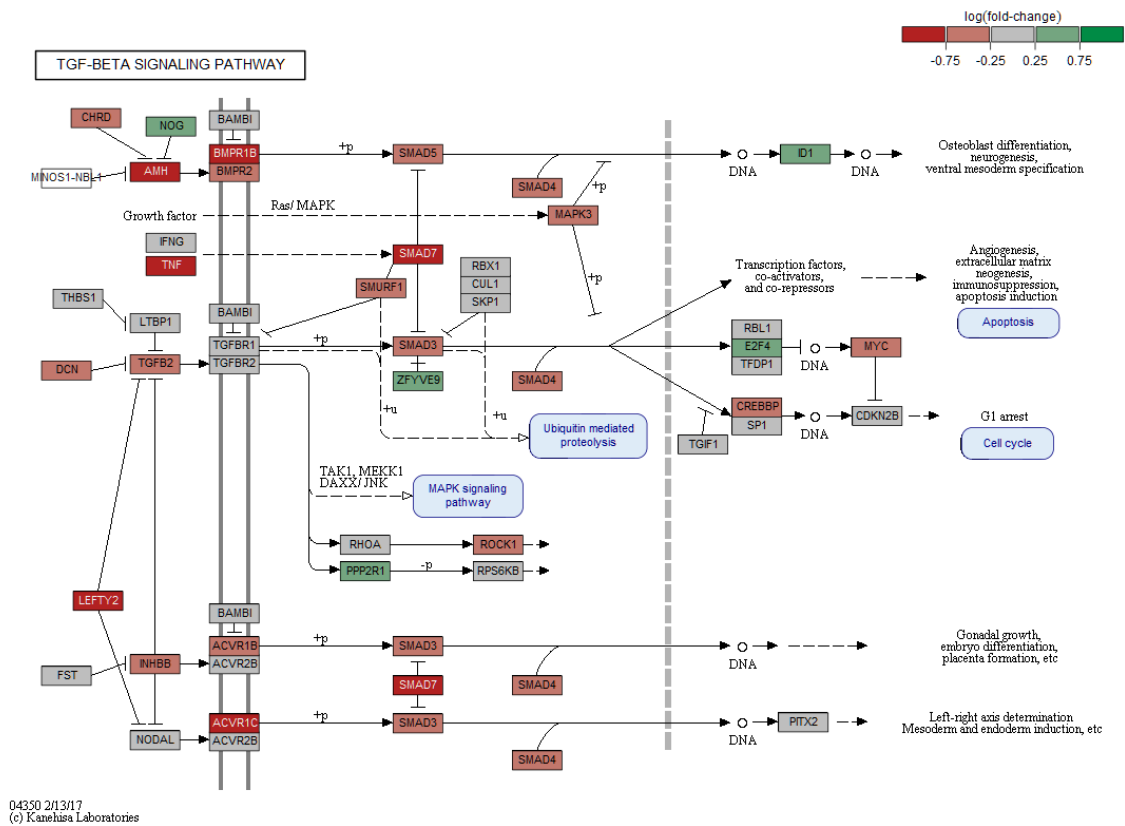


Abbildung 39: Aufschlüsselung der Beeinflussung des TGF- $\beta$  Signalweges durch hC0-C1f (KEGG Analyse).

Mittels Western Blots wurde anschließend überprüft, ob nach hC0-C1f Stimulation eine Phosphorylierung von ERK oder SMAD3 zu beobachten war (Abbildung 40).

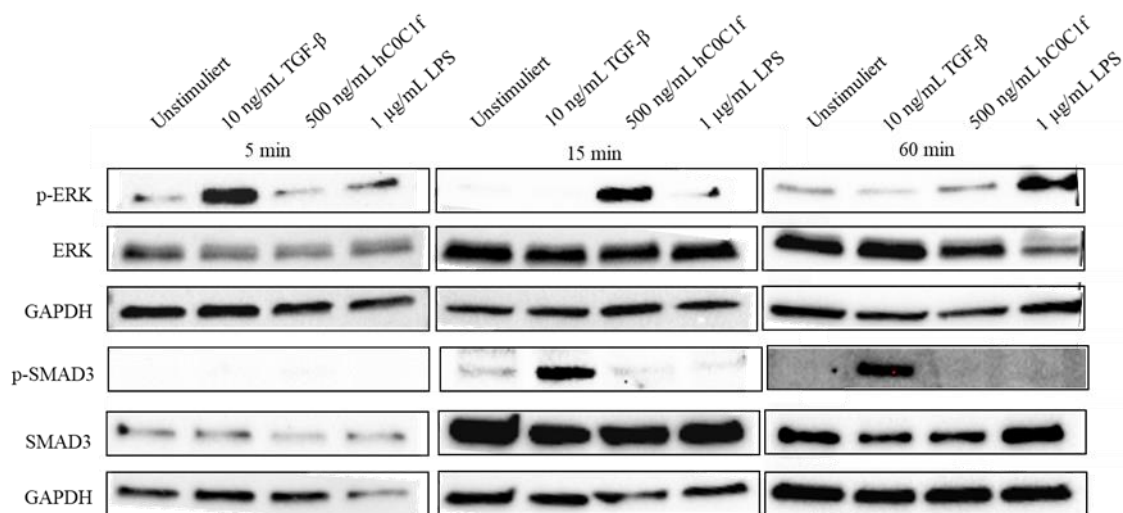


Abbildung 40: Phosphorylierung von ERK und SMAD3 durch TGF- $\beta$ , hC0-C1f und LPS nach fünf, 15 und 60 Minuten. Fünf Minuten nach TGF- $\beta$  Stimulation zeigte sich eine deutliche Phosphorylierung von ERK, welche im Verlauf abnahm. hC0-C1f und LPS zeigten nach 15 bzw. 60 Minuten eine Phosphorylierung von ERK. SMAD3 wurde lediglich durch TGF- $\beta$  nach 15 Minuten phosphoryliert. Die Phosphorylierung war auch noch nach 60 Minuten nachweisbar.

Es zeigte sich, dass die TGF- $\beta$  Stimulation bereits nach fünf Minuten zu einer Phosphorylierung von ERK und nach 15 Minuten zu einer Phosphorylierung von SMAD3 führte. LPS und hC0-C1f führten zu keiner Phosphorylierung von SMAD3. ERK wurde durch hC0-C1f Stimulation und LPS Stimulation nach 15 Minuten bzw. 60 Minuten phosphoryliert.

#### **3.2.6 Inhibition der Effekte von C0-C1f auf humane Fibroblasten**

Um therapeutisch in den durch C0-C1f aktivierten Signalweg einzugreifen, wurden die Signalwege an verschiedenen Stellen mittels kommerzieller Substanzen inhibiert. Hierfür wurde

- (i) TLR4 mittels CLI095
- (ii) NF $\kappa$ B mittels Bay11-7085
- (iii) TLR2/TLR1 mittel CuCPT22
- (iv) RAGE mittels FPS-ZM1

inhibiert. Es zeigte sich, dass *CXCL-1*, *CCL-2* sowie *MMP-9* nach sechsständiger Stimulation mit hC0-C1f signifikant induziert wurden (Abbildung 41). Durch Inhibition des TLR4-Rezeptors bzw. NF $\kappa$ B wurde die Induktion von *CXCL-1* durch hC0-C1f nahezu vollständig supprimiert (Abbildung 41). Die *CCL-2* mRNA Induktion durch hC0-C1f wurde durch CLI095 sowie Bay11-7085 ebenfalls deutlich reduziert, wohingegen die *MMP-9* mRNA Induktion nicht beeinflusst wurde (Abbildung 41).



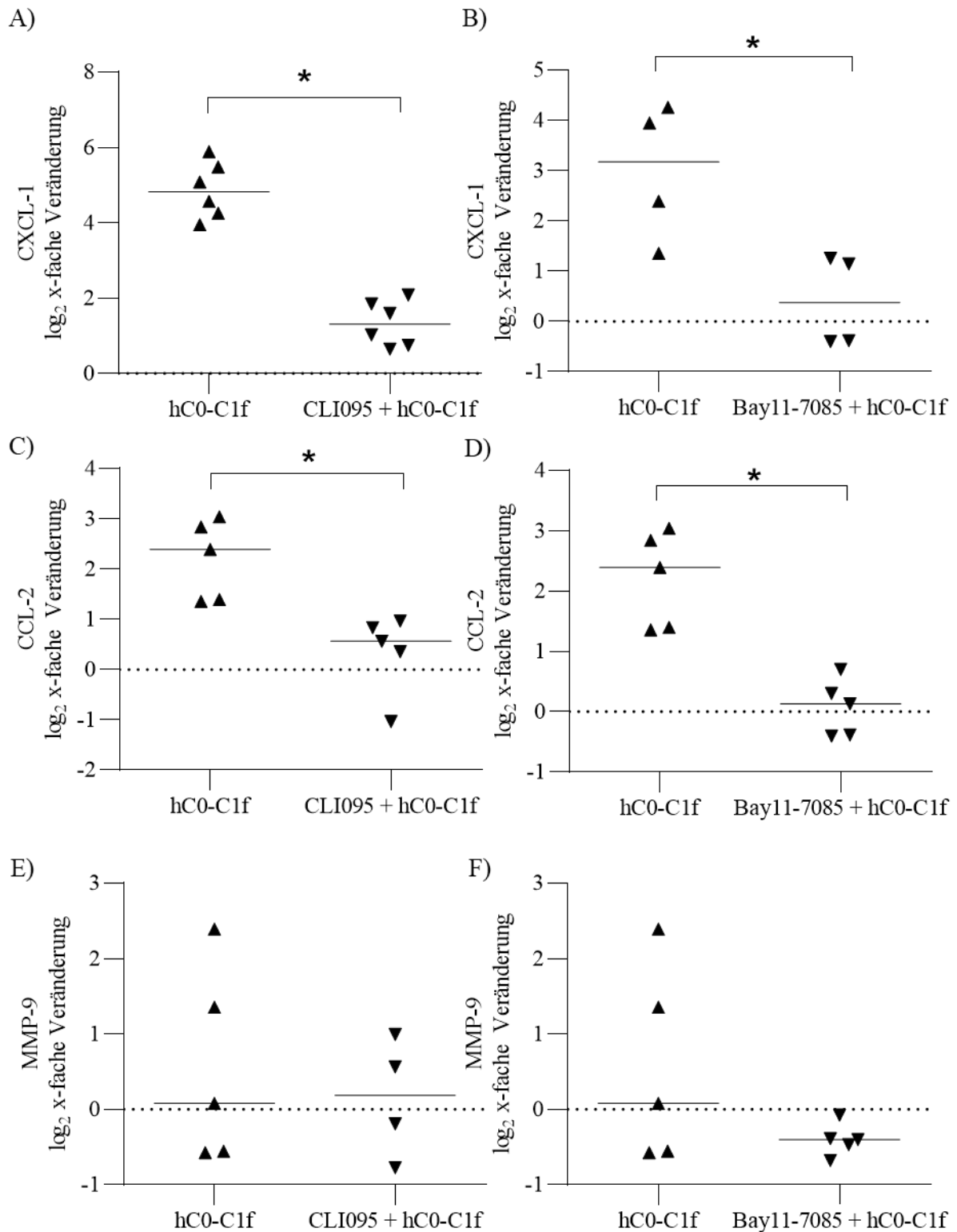


Abbildung 41: Inhibition des TLR4 und NF $\kappa$ B Signalweges mittels kommerzieller Inhibitoren. Nach Vorbehandlung der Zellen mit CLI095 (TLR4-Inhibitor) sowie Bay11-7085 (NF $\kappa$ B-Inhibitor) war keine Induktion von CXCL-1 und CCL-2 durch hC0-C1f nachweisbar. \* = statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ), modifiziert nach [157].

Es zeigte sich, dass die Vorbehandlung der Zellen mit FPS-ZM1 bzw. CuCPT22 zu einer verstärkten Induktion von CXCL-1 sowie CCL-2 nach Stimulation mit hC0-C1f führte

(Abbildung 42). MMP-9 mRNA Induktion durch hC0-C1f wurde durch diese Inhibitoren nicht beeinflusst (Abbildung 42).

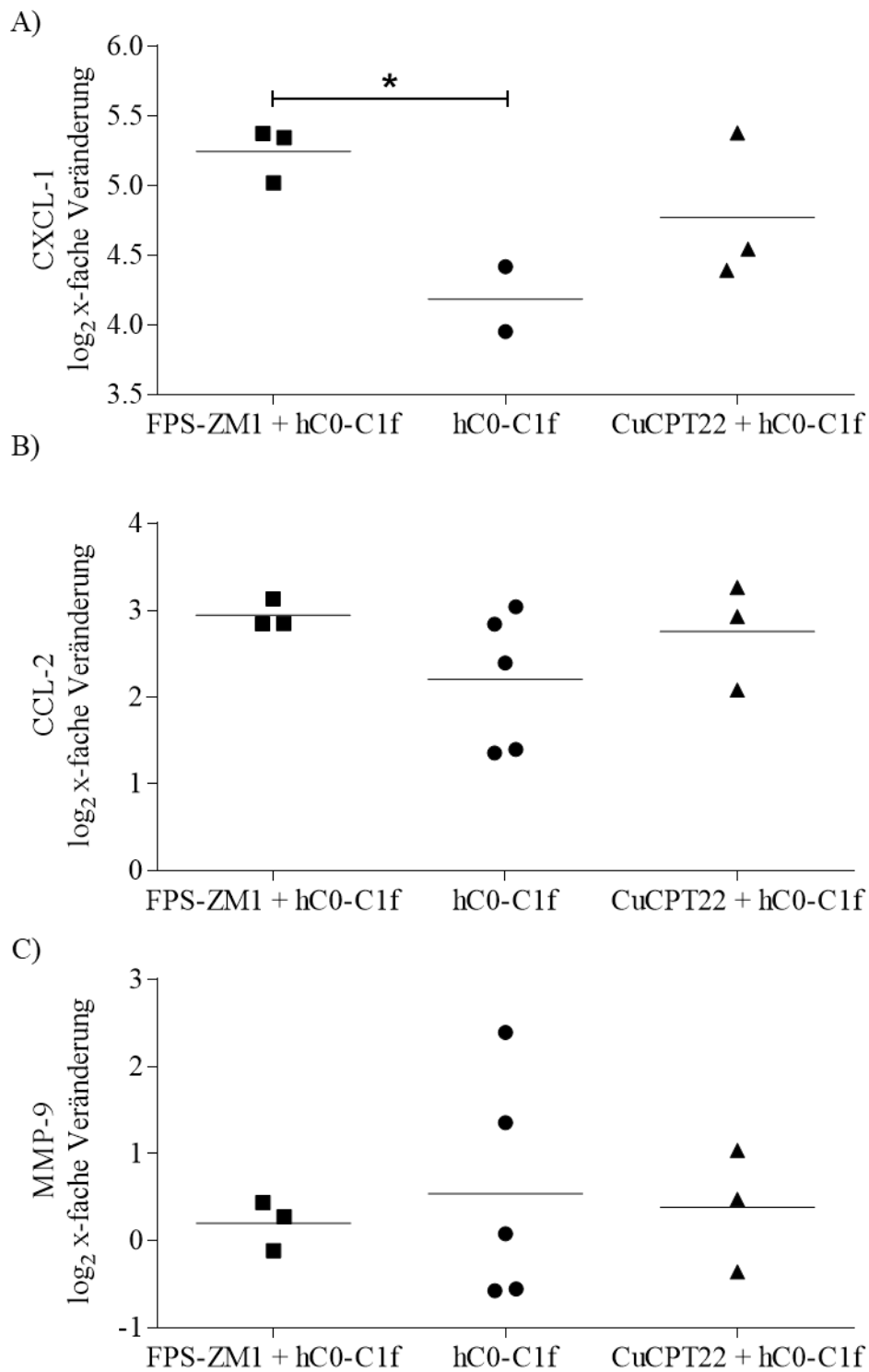


Abbildung 42: Inhibition von RAGE und TLR2 mittels konventioneller Inhibitoren. Mittels RAGE und TLR2 Inhibitoren war keine Inhibition des Einflusses von hC0-C1f auf die CXCL-1, CCL-2 sowie MMP-9 mRNA Expression möglich. \* = statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

Die 24-stündige Stimulation mit hC0-C1f induzierte weiterhin signifikant die CXCL-1 mRNA Expression (Abbildung 43). Stimulationen über 24 Stunden nach Inhibition zeigten keine Herunterregulation der CXCL-1 mRNA Induktion durch hC0-C1f unter Verwendung des TLR2-, NFκB- sowie RAGE-Inhibitors (Abbildung 43). Mit Hilfe des TLR4-Inhibitors konnte jedoch eine signifikante Inhibition bei 24-stündiger Stimulation erreicht werden. Diese Reduktion ist jedoch im Vergleich zum 6-Stunden Zeitpunkt deutlich geringer (Abbildung 43).

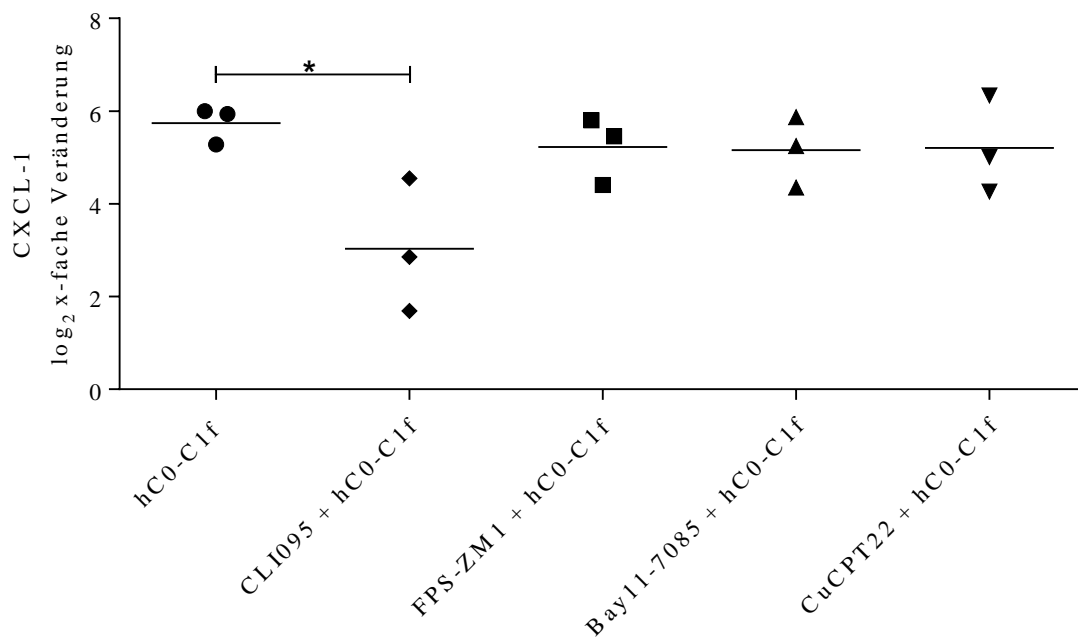


Abbildung 43: Einfluss der konventionellen Inhibitoren auf die CXCL-1 Expression nach 24-stündiger hC0-C1f Stimulation. \* = statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

## 4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war, die Relevanz und den Einfluss des N-terminalen Fragmentes des Myosin-bindenden Protein C, C0-C1f, auf Fibroblasten zu untersuchen. Durch Inhibition der zugrundeliegenden Signalwege sollten gezielte Interventionsmöglichkeiten etabliert werden.

### 4.1 Freisetzung von C0-C1f nach myokardialer Ischämie

Es stellte sich zunächst die Frage, ob C0-C1f nach einem Myokardinfarkt freigesetzt wird und somit als Biomarker sowie therapeutisches Ziel genutzt werden kann.

#### 4.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Aufgrund der Homologie zwischen C0-C1f und cMyBP-C in voller Länge (im weiteren als cMyBP-C beschrieben) ist die Entwicklung eines Antikörpers spezifisch für C0-C1f durch die Immunisierung von Tieren nahezu unmöglich [83, 153]. In unserem Auftrag entwickelte ProSci einen neuen murinen Antikörper gegen hC0-C1f. Im Laufe der Charakterisierung zeigte sich, dass dieser Antikörper (H8) nicht spezifisch C0-C1f bindet. In der Tat bindet dieser Antikörper alle in dieser Arbeit getesteten Fragmente des cMyBP-C, so dass von einer N-terminalen Bindung des cMyBP-C auszugehen ist. Da jedoch die skelettalen Isoformen des MyBP-C nicht gebunden werden, ist die Bindungsstelle mit hoher Wahrscheinlichkeit auf der C0-Domäne (Abbildung 12). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Depletion von Peptiden länger als C0-C1f mittels an magnetische Beads gekoppelter Antikörper effektiv nutzbar ist. Damit wurde eine Möglichkeit zur spezifischeren Detektion von C0-C1f etabliert. Durch das Verwenden eines kommerziell erhältlichen ELISA Kits für cMyBP-C, welches durch die N-terminale Bindung der verwendeten Antikörper sowohl cMyBP-C als auch C0-C1f detektieren kann, konnte die cMyBP-C sowie C0-C1f Konzentration in Patienten mit einem ACS bestimmt werden. Es zeigte sich, dass circa 40 % des freigesetzten cMyBP-C (inklusive N-terminaler Fragmente) auch nach der Depletion detektierbar war, weshalb davon auszugehen ist, dass es sich hierbei um das 40 kDa schwere C0-C1f handelt. Zusammenfassend wurde somit ein Verfahren zur Detektion von C0-C1f entwickelt. Erste Messungen zeigten, dass der Nachweis von C0-C1f in Patienten mit einem ACS möglich ist. Mit Hilfe dieses Verfahrens ließe sich daher künftig die Rolle des C0-C1f als potenzieller kardialer Biomarker evaluieren.

#### 4.1.2 Diskussion der Ergebnisse

Bereits im Jahr 2012 postulierte die Arbeitsgruppe um Professor Sadayappan, dass cMyBP-C ein potenzieller kardialer Biomarker ist und eine frühzeitige Detektion eines Myokardinfarktes erlauben könnte [41]. Mittels Immunpräzipitation konnte in neonatalen Ratten gezeigt werden, dass cMyBP-C – aber auch ein 40 kDa großes Peptid – innerhalb kürzester Zeit nach Ligation einer Koronararterie freigesetzt wird [40]. Daraufhin wurde ein Sandwich-ELISA entwickelt, mit dem die cMyBP-C Konzentration in Ratten sowie Menschen gemessen werden konnte. Es zeigte sich, dass die cMyBP-C Konzentration in Patienten nach myokardialer Ischämie mit einer Vervielfachung um 230x deutlich über dem normalen Spiegel lag [40]. Eine größer angelegte Studie derselben Arbeitsgruppe zeigte, dass in ACS Patienten die cMyBP-C Konzentration fünffach höher war als in der Kontrollgruppe [39]. Bemerkenswerterweise zeigte sich ein cMyBP-C Konzentrationsabfall bereits zwölf Stunden nach einer perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) [38]. Dies unterstützt die Hypothese, dass cMyBP-C bzw. C0-C1f nur kurzfristig nach einem Myokardinfarkt im Blutkreislauf vorzufinden sind [87]. Gleichzeitig entwickelte die Arbeitsgruppe um Professor Marber in Kooperation mit Merck Millipore eine hoch-sensitive Detektionsmethode für cMyBP-C mit einer *Lower Limit of Detection* (LLOD) von 0,4 ng/L [92]. Es zeigte sich, dass die cMyBP-C Konzentration linear mit der Troponin T Konzentration korrelierte [92]. Mit Hilfe dieses Assays konnten translationale Studien durchgeführt werden, um den Nutzen von cMyBP-C im klinischen Alltag zu verifizieren [6, 57-61, 129]. Die diskriminatorische Stärke von cMyBP-C bezüglich der Detektion eines Myokardinfarktes ist nach aktueller Datenlage mit der diskriminatorischen Stärke von Troponin vergleichbar [61]. Die Kombination von cMyBP-C mit Troponin I/T führte zu einer deutlichen Erhöhung der Fläche unter der *Receiver-Operating Characteristic* Kurve der Biomarker [61].

Da C0-C1f im Gegensatz zu cMyBP-C physiologisch nicht im Blut zirkuliert, liegt die Vermutung nahe, dass C0-C1f alleine oder in Kombination mit Troponin zu einer Verbesserung der Diagnostik des ACS führen kann [87]. Durch die Etablierung einer Nachweismethode für C0-C1f sowie den erstmaligen Nachweis des relativen Anteils von C0-C1f am freigesetzten cMyBP-C konnten in dieser Arbeit die ersten Daten für diese Hypothese erzeugt werden. Zudem konnte anhand von Korrelationsanalysen gezeigt werden, dass die cMyBP-C Konzentration (inklusive C0-C1f) von Patienten mit einem ACS mit verschiedenen kardialen Biomarkern korreliert.

#### 4.2 Pathophysiologische Rolle des freigesetzten C0-C1f

Da C0-C1f nun erstmals in Patienten mit einem ACS nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage nach der funktionellen Rolle des C0-C1f nach myokardialer Ischämie. Insbesondere der Hintergrund, dass es sich bei C0-C1f nicht um ein arbiträres, durch Nekrose freigesetztes Strukturprotein handelt, sondern um das Produkt einer aktiven  $\mu$ -Calpain abhängigen Spaltung des cMyBP-C, sprach a priori für eine potenziell wichtige Rolle des C0-C1f als Regulator des kardialen Remodelings nach myokardialer Ischämie.

Entgegen der ursprünglichen Hypothese, dass es sich bei Fibroblasten um quieszente Zellen handelt, die lediglich durch Transdifferenzierung zur Narbenbildung beitragen, zeigten Studien der vergangenen Jahre die mannigfaltige Funktion von Fibroblasten [24, 132, 134]: Bereits am ersten Tag nach myokardialer Ischämie kommt es zur Aktivierung von Fibroblasten [24]. Es stellte sich heraus, dass Fibroblasten nicht nur als Empfänger verschiedener Mediatoren dienen, sondern ebenfalls in der Lage sind, diese Mediatoren zu produzieren [24, 115]. Nekrotische Zellen, darunter Kardiomyozyten, setzen DAMPs frei, die zur Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen durch Fibroblasten führen [49, 115, 132]. Unter anderem kommt es über die Aktivierung des TLR4 zur Freisetzung von IL-6 sowie Chemokinen [71, 132, 159]. Die darauffolgende Einwanderung von Immunzellen setzt unter anderem MMPs frei, um so den Infarktbereich von Zelldebris (vor allem nekrotischen Kardiomyozyten) zu befreien [24, 132]. Zudem konnte anhand von ex vivo Transkriptom Analysen festgestellt werden, dass Fibroblasten in diesem frühen Stadium durch die Beeinflussung von Apoptose-regulierenden Genen einen sogenannten *pro-survival* Phänotyp einnehmen [24]. In fortgeschritteneren Stadien nach myokardialer Ischämie kommt es zur Transdifferenzierung von Fibroblasten sowie zur Narbenbildung [139]. In dem frühen Stadium nach myokardialer Ischämie ist jedoch eine Transdifferenzierung der Fibroblasten nicht physiologisch [24, 31]. Daher ist es essenziell, dass dieser Prozess präzise reguliert und initial inhibiert wird. Nach wenigen Tagen muss jedoch die Transdifferenzierung der Fibroblasten mit intrazellulärer  $\alpha$ SMA Induktion und vermehrter Bildung von extrazellulärer Matrix zwecks Narbenbildung beginnen [24, 31]. Ein Protein, das nur kurzfristig nach myokardialer Ischämie in lokal sehr hohen Konzentrationen vorliegt, ist folgerichtig ein geeigneter Regulator für diesen Prozess. Diese Voraussetzung werden durch C0-C1f erfüllt, so dass die pathophysiologischen

Funktionen des C0-C1f in den frühen Phasen nach myokardialer Ischämie in Fibroblasten von besonderer Relevanz sind [87].

#### **4.2.1 Zusammenfassung der Ergebnisse**

##### **Etablierung und Vergleich verschiedener Isolationsmethoden für Fibroblasten**

Zunächst wurden verschiedene Methoden zur Isolation von Fibroblasten aus murinen Herzen etabliert. Nach Etablierung und Optimierung der einzelnen Isolationsmethoden zeigte sich, dass die Funktion und Morphologie der Zellen trotz des unterschiedlichen experimentellen Aufwandes, der unterschiedlichen Expandierfähigkeit sowie der unterschiedlichen Zellzahl keine Unterschiede aufwiesen. TGF- $\beta$ , einer der potentesten natürlich vorkommenden pro-fibrotischen Substanzen, führte unabhängig von der Isolationsmethode zu einer Transdifferenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten. Zusätzlich wurde die Kollagensynthese durch TGF- $\beta$  stimuliert, so dass die Funktion der Fibroblasten nicht wesentlich durch die Isolationsmethode beeinflusst wurde. Folglich war von funktionsfähigen Fibroblasten auszugehen. Dies ließ sich anhand immunhistochemischer Färbungen bestätigen.

##### **Einfluss von C0-C1f auf inflammatorische und pro-fibrotische Signalwege in Fibroblasten**

Bemerkenswerterweise war die Herkunft der Fibroblasten (murine bzw. humane Zellen, kardiale bzw. Vorhaut-Zellen) für den Effekt von C0-C1f irrelevant, da alle getesteten Zelltypen ähnliche Effekte zeigten. Abbildung 44 zeigt zusammenfassend eine schematische Übersicht der möglichen Einflüsse von C0-C1f auf die verschiedenen Signalwege sowie deren Produkte. Diese Effekte konnten sowohl in primären kardialen Fibroblasten als auch mit Hilfe der immortalisierten Fibroblasten Zelllinie nachgewiesen werden, so dass der Einfluss von Verunreinigungen der primären Zellen (z.B. mit Makrophagen (CD68<sup>+</sup> Zellen)) vernachlässigbar war.

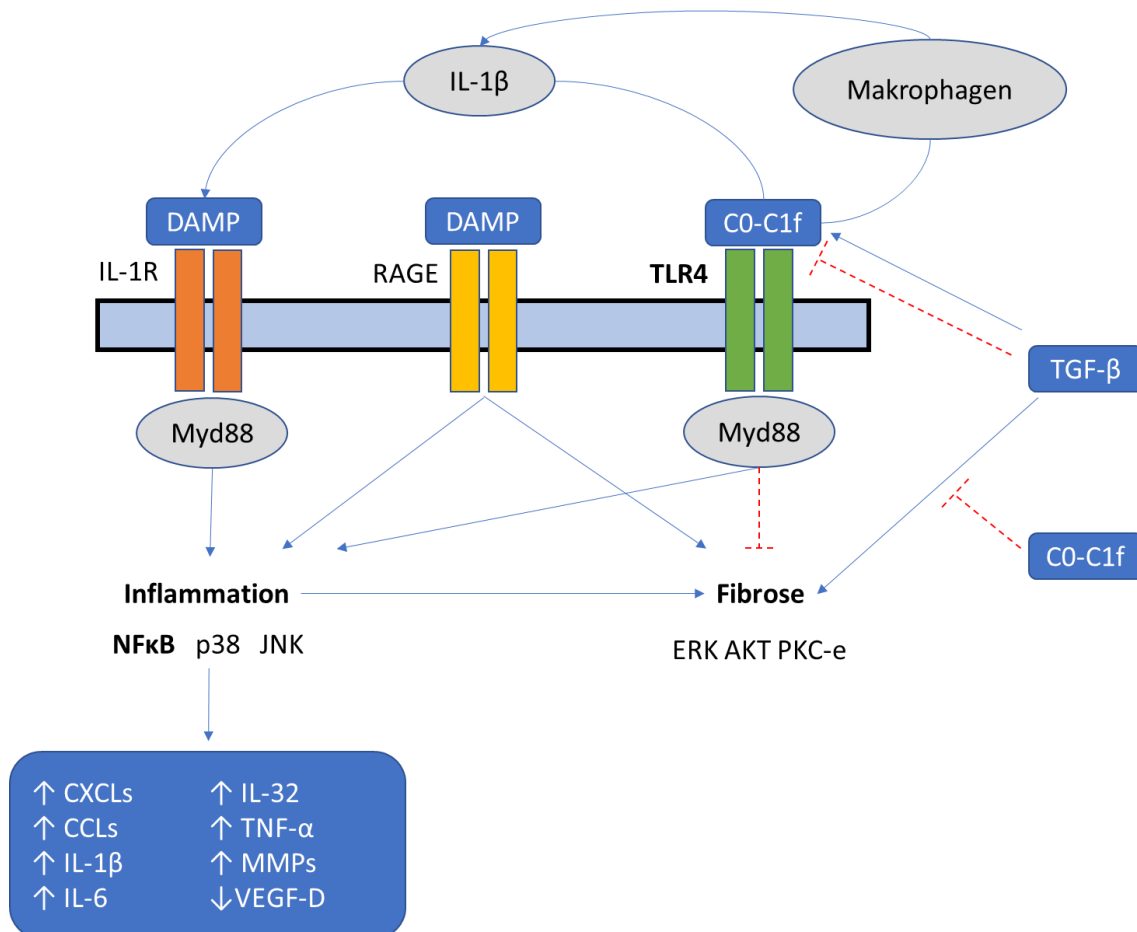


Abbildung 44: C0-C1f aktiviert über TLR4 den MAP-Kinase Signalweg in Fibroblasten. Durch die Induktion des Transkriptionsfaktors NFκB kommt es initial zur Freisetzung inflammatorischer Zytokine, wie dem IL-1β, IL-6 und TNF-α. TGF-β hemmt die C0-C1f vermittelte inflammatorische Antwort, jedoch wird durch die Ko-Stimulation von Fibroblasten mit TGF-β und C0-C1f die Induktion von Chemokinen (CXCL-1, CCL-2) initial potenziert.

C0-C1f aktivierte ähnliche Signalwege wie DAMPs und PAMPs [140]. In der Tat führte C0-C1f in Fibroblasten zur Induktion pro-inflammatorischer Zytokine (unter anderem IL-1β, IL-6, TNF-α). Insbesondere die Induktion von TNF-α konnte in dieser Arbeit mit Hilfe einer innovativen, Bead-basierten Detektionsmethode auf Proteinebene gezeigt werden. Chemokine, wie CXCL-1 oder CCL-2, wurden ebenfalls durch C0-C1f auf mRNA Ebene hochreguliert. Der deutliche Unterschied der IL-1β mRNA Induktion nach C0-C1f Stimulation zwischen primären Fibroblasten und der verwendeten Zelllinie lässt sich am ehesten durch die „Verunreinigung“ der primären Fibroblasten mit CD68<sup>+</sup> Zellen erklären. Nichtsdestotrotz beeinflusst dies keinesfalls die Relevanz des C0-C1f nach myokardialer Ischämie, da ein Effekt von C0-C1f auf Monozyten/Makrophagen bereits vorbeschrieben ist [83]. Die induzierte Chemotaxis in Kombination mit der Fähigkeit von C0-C1f, synergistische Effekte in Monozyten/Makrophagen auszulösen, erhöht vielmehr



den Einfluss von C0-C1f auf das inflammatorische Geschehen nach myokardialer Ischämie [83].

C0-C1f beeinflusste des Weiteren *MMPs*, *BIRC3*, *IL-32* sowie *VEGF-D* (synonym *FIGF*). C0-C1f führte außerdem zu einer tendenziell vermehrten Kollagenproduktion in den Fibroblasten. Western Blots zeigten zwei Banden des Kollagen Typ 1: Ursächlich für die zwei Banden sind am ehesten verschiedene Isoformen/Splice-Varianten des Proteins [7]. TGF- $\beta$  zeigte eine Induktion beider Isoformen, wohingegen C0-C1f ausschließlich zu einer Induktion der kleineren Isoform des Kollagens führte. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass C0-C1f einen Einfluss auf die Aktivierung von Fibroblasten durch TGF- $\beta$  hat (und vice versa). TGF- $\beta$  verstärkte einerseits die Effekte von C0-C1f auf *MMPs*, *CXCLs*, *CCLs* und *IL-32*. Andererseits wurden jedoch auch Effekte von TGF- $\beta$  auf die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten durch C0-C1f supprimiert. Interessanterweise wurden die fibrotischen Signalwege der Fibroblasten wider Erwarten nicht durch C0-C1f induziert [97, 98]. Die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und die entsprechend vermehrte Expression von intrazellulärem  $\alpha$ SMA, kodiert durch das Gen *ACTA2*, wurde sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene gegenteilig reduziert.

### **Inhibition der Einflüsse von C0-C1f auf Fibroblasten**

Durch gezielte Inhibition des TLR4 sowie des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B konnten die Effekte von C0-C1f auf Fibroblasten erfolgreich inhibiert werden. Folglich ist dieser Signalweg hauptsächlich für die Auswirkungen von C0-C1f auf Fibroblasten verantwortlich. Durch die Inhibition des TLR1/2 oder RAGE wurde hingegen keine Inhibition der C0-C1f vermittelten Effekte beobachtet. Bei längerfristigen Stimulationen zeigte lediglich die Inhibition des TLR4 eine signifikante Reduktion der *CXCL-1* Freisetzung nach C0-C1f Stimulation.

### **4.2.2 Diskussion der Methodik**

Der Einfluss von C0-C1f auf Fibroblasten wurde sowohl auf Genexpressionsebene als auch auf Proteinebene untersucht. Die Effekte des C0-C1f auf die Transkription verschiedener Gene in Fibroblasten konnten mit Hilfe von Microarray Analysen unvoreingenommen evaluiert werden. Zusätzlich erfolgte eine Validierung dieser Ergebnisse mittels RT-qPCR. Des Weiteren konnten die so entwickelten Hypothesen

durch den Nachweis der entsprechenden Proteine mit Hilfe des Quanterix Assays sowie immunhistochemischer Färbungen untermauert werden.

Interessanterweise wurden Fibroblasten nicht nur durch C0-C1f, sondern ebenfalls durch das kürzere Peptid C0-L aktiviert. Die Genaktivierung war deutlich schwächer ausgeprägt und unterschied sich teilweise von dem Effekt von C0-C1f auf Fibroblasten. Da nur C0-C1f die hier beschriebene starke pro-inflammatorische und anti-fibrotische Antwort zeigt, ist von keiner artifiziellen sowie methodischen (bzw. produktionsbedingten) Ursache für diese Beobachtungen auszugehen. Die nachweislich Endotoxin-freie Produktion von C0-C1f in *ClearColi* führte zu keiner Veränderung des Effektes von C0-C1f auf Chemokine, *MMPs* sowie *ICAM-1*. Auch die Inhibition von Endotoxin-vermittelten Effekten via Polymyxin B führte zu keiner Verminderung der beobachteten Effekte, wohingegen Proteinase K durch die Spaltung von C0-C1f zu einer deutlichen Abschwächung der Effekte des C0-C1f auf Chemokine führte [23]. Dies spricht ebenfalls dafür, dass die beobachteten Effekte spezifisch durch C0-C1f ausgelöst werden [108].

### 4.2.3 Diskussion der Ergebnisse

#### **Einfluss von C0-C1f auf die Inflammation nach myokardialer Ischämie**

Vorherige Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten bereits, dass C0-C1f eine wichtige Rolle für die Induktion und das Aufrechterhalten eines inflammatorischen Milieus nach myokardialer Ischämie spielt [83]. Die C0-C1f vermittelte Aktivierung von Monozyten bzw. Makrophagen führte *in-vitro* zu einer enormen Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen [83]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass C0-C1f auch in Fibroblasten zu einer pro-inflammatorischen Antwort via Chemokin- sowie Zytokin-Induktion führt. Durch die Induktion von *ICAM-1* kommt es zur verstärkten Adhäsion von neutrophilen Granulozyten sowie Monozyten, so dass mehr Immunzellen in der Umgebung des ischämischen Areals präsent sind. Diese wandern dann entlang des Chemokin-Gradienten zum Ort des hypoxischen Ereignisses [30]. Die anschließende Funktion der eingewanderten Immunzellen ist unter anderem der Abtransport des anfallenden Zelldebris [24, 30]. Folglich dient C0-C1f sowohl der Rekrutierung als auch der Aktivierung von Immunzellen. Diese Eigenschaften heben die zuvor von Lipps et al. beschriebene Relevanz des C0-C1f als einer der Hauptakteure für die post-ischämische Inflammation weiter hervor, da die Chemokin Freisetzung die Relevanz des Effektes von C0-C1f auf Makrophagen deutlich verstärkt [83].

Die übergeordnete Funktion von Chemokinen, zu denen sowohl C-X-C Motiv als auch C-C Motiv Chemokine gehören, ist die Rekrutierung von Immunzellen, insbesondere Monozyten/Makrophagen, Lymphozyten sowie neutrophile Granulozyten [27]. Unterschieden werden in diesen Zusammenhang Chemokine, die der Homöostase oder der Inflammation dienen sowie Chemokine, die sowohl der Homöostase als auch der Inflammation dienen [27]. Die durch C0-C1f am stärksten induzierten Chemokine lassen sich alle der Inflammation zuordnen [27]. *In-vivo* Studien bestätigen, dass CCL-2 durch myokardiale Ischämie induziert wird [62, 70, 142]. Die Inhibition von CCL-2 nach myokardialer Ischämie zeigte interessanterweise nicht nur eine verminderte Inflammation, sondern auch eine geringere linksventrikuläre Dilatation und geringeres maladaptives Remodeling des Herzens [28, 121, 122]. Jedoch zeigten transgene Mäuse mit absoluter CCL-2 Defizienz aufgrund des kompletten Fehlens dieses Chemokins eine verzögerte Phagozytose abgestorbener Kardiomyozyten [28]. In Einklang zu diesen Ergebnissen konnte *in-vivo* gezeigt werden, dass eine verminderte CCL-2 Expression sowohl in Ratten als auch in Mäusen mit einem kleineren Infarktareal nach myokardialer Ischämie einhergeht [82, 107]. Es wird vermutet, dass unter anderem eine direkte Interaktion von CCL-2 mit Kardiomyozyten hierfür ursächlich ist, da *in-vitro* gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung des CCL-2 Rezeptors (CCR-2) pro-apoptotisch wirkt und somit zu vergrößerten Infarktarealen aber auch linksventrikulärer Dysfunktion führen kann [14, 160]. Eine Inhibition des C0-C1f könnte somit über eine Verminderung der Freisetzung von CCL-2 mit konsekutiv verminderter Aktivierung des CCR-2 sowohl zu kleineren Infarktarealen als auch zu einer verbesserten linksventrikulären Funktion führen.

Analog zu den Ergebnissen in Makrophagen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass C0-C1f in Fibroblasten zu vermehrter Transkription und Translation von TNF- $\alpha$  führt. Die Produktion von TNF- $\alpha$  nach C0-C1f Exposition ist relevant, da Studien gezeigt haben, dass erhöhte TNF- $\alpha$  Konzentrationen nach Myokardinfarkten mit einem schlechteren Überleben assoziiert sind [37]. *In-vivo* konnte unter Verwendung von Tnf- $\alpha$  Knockout Mäusen gezeigt werden, dass das Ausmaß des Infarktes sowie die Produktion von Chemokinen nach Reperfusion signifikant reduziert wurde [90]. Daher wurde postuliert, dass geringere TNF- $\alpha$  Konzentrationen in den frühen Phasen der Ischämie/Reperfusion kardioprotektiv seien. Außerdem konnte *in-vivo* gezeigt werden, dass durch die extreme inflammatorische und matrixdegradierende Antwort auf TNF- $\alpha$

die Gefahr für Myokardrupturen sowie linkventrikuläre Dysfunktionen erhöht wird [138]. Dies spricht für eine potenziell schädliche Rolle des C0-C1f in der akuten Phase nach myokardialer Ischämie, welche durch Inhibition von C0-C1f reduziert werden könnte. Limitierend ist allerdings, dass auch positive Eigenschaften von TNF- $\alpha$  nach myokardialer Ischämie beschrieben wurden [55, 103, 144].

Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *IL-32* durch C0-C1f reguliert wird. *IL-32* ist ein Zytokin, welches den MAPK/ERK und NF- $\kappa$ B Signalweg aktiviert und wurde kürzlich erstmals beschrieben [64, 89]. Studien haben gezeigt, dass das Supprimieren von endogenem *IL-32* zur signifikanten Verringerung der TLR Aktivierung führt [56]. Daher ist naheliegend, dass durch C0-C1f die Antwort auf verschiedenste DAMPs, welche nach myokardialer Ischämie unter anderem über TLR2 und TLR4 agieren, forciert werden könnte [73, 148, 158]. Dies führt zur vermehrten Freisetzung von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 sowie weiterer Zytokine (z.B. IL-8, CXCL-2) und kann damit zur Entstehung und Aufrechterhaltung der pro-inflammatorischen Mikroumgebung beitragen [64, 89, 104]. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass C0-C1f gegebenenfalls zu späteren Zeitpunkten, die in dieser Arbeit nicht überprüft wurden, über *IL-32* zur Aufrechterhaltung der Inflammation beitragen kann. Dies bestätigt die entwickelte Hypothese, dass eine Inhibition der Effekte von C0-C1f durch mittel- bis langfristige Supprimierung der Inflammation nach myokardialer Ischämie protektiv wirken könnte.

Es ist zudem belegt, dass eine verfrühte und verstärkte Fibrosierung eines hypoxischen Areales zu vermehrter Herzinsuffizienz führt [31]. Inflammation, vor allem IL-1 $\beta$ , inhibiert die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten sowie die Freisetzung von extrazellulärer Matrix [100]. C0-C1f führt sowohl in Fibroblasten als auch in Makrophagen zu einer vermehrten Transkription von *IL-1 $\beta$* , wodurch eine verfrühte Fibrosierung verzögert werden könnte [83]. Da C0-C1f fast ausschließlich zu frühen Zeitpunkten nach myokardialer Ischämie vorhanden ist, kann man C0-C1f somit ebenfalls protektive Eigenschaften in sehr frühen Zeitpunkten nach myokardialer Ischämie zuschreiben [87]: Erst nach Abfall der C0-C1f und somit auch der IL-1 $\beta$  Konzentration sowie Phagozytose des Zelldebris sind Fibroblasten in der Lage, zu Myofibroblasten zu differenzieren.

Durch die erst kürzlich publizierten Ergebnisse der Cantos-Studie konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Inflammation nach myokardialer Ischämie auch im klinischen

Rahmen protektiv ist [2, 3, 121, 122]. Durch das Identifizieren von Zielstrukturen wie C0-C1f, die bereits frühzeitig nach Beginn der Ischämie maßgeblich zu diesem inflammatorischen Geschehen beitragen, sowie zugrundeliegender Signalwege können Ansatzpunkte für künftige Interventionsmöglichkeiten geschaffen werden. Die hier entwickelte Hypothese, dass die Depletion von C0-C1f bzw. die Reduktion von dessen Effekten kardioprotektiv sein könnte, wurde bereits durch erste *in-vivo* Studien bestätigt [10]. Es konnte gezeigt werden, dass die Ablation der Proteolyse-Stelle im cMyBP-C für  $\mu$ -Calpain nach einem re-perfundierten Myokardinfarkt zu einer geringeren Infarktgröße führt [10]. Da diese Ablation eine Freisetzung von C0-C1f verhindert, bestätigt dies die potentielle Kardioprotektion durch Inhibition von C0-C1f selbst oder der in dieser Arbeit offengelegten Signalwege [87].

### **Einfluss von C0-C1f auf die Angiogeneese nach myokardialer Ischämie**

Nach einem Herzinfarkt ist die Angiogeneese als Adaptation an die Hypoxie wesentlich. Physiologisch wird erst nach circa drei Tagen durch das Abklingen der Inflammation der VEGF-Signalweg aktiviert, wodurch der pro-angiogeneetische und pro-fibrotische Teil des Remodelings beginnt [24]. Auch in diesem Zusammenhang scheint C0-C1f eine regulatorische Rolle zu spielen, da C0-C1f die Expression von VEGF-D vermindert. VEGF-D ist die stärkste pro-angiogeneetische Form aller VEGFs und spielt somit eine zentrale Rolle im Rahmen der Adaptation an Hypoxie [123]. Eine Inhibition dieses Prozesses durch das frühzeitig freigesetzte C0-C1f in der ersten Phase des Remodelings (Abbildung 3) verzögert somit den Beginn der Angiogeneese. Durch sinkende Konzentrationen von C0-C1f einige Tage nach myokardialer Ischämie kann es schließlich zum Beginn der Angiogeneese kommen. Durch Inhibieren der Effekte von C0-C1f auf VEGF-D könnte eine verstärkte Angiogeneese und somit eine verbesserte Adaptation an die myokardiale Ischämie gewährleistet werden.

### **Einfluss von C0-C1f auf das Remodeling nach myokardialer Ischämie**

In dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass vor allem bei längerer Stimulation sowie in Anwesenheit von TGF- $\beta$  eine beachtliche Induktion von *MMPs* durch C0-C1f ausgelöst wird. Studien weisen darauf hin, dass Fibroblasten erst nach der Stimulation durch IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$  über den MAPK Signalweg MMP-9 freisetzen [16]. Dies erklärt die Beobachtung, dass *MMP-9* mit steigender Stimulationsdauer stetig stärker induziert wurde. Auch eine Beteiligung des zu späteren Zeitpunkten freigesetzten IL-32

ist denkbar [155]. MMPs gelten als zentrale Modulatoren des linksventrikulären Remodelings nach myokardialer Ischämie [53]. MMPs führen im Rahmen des Heilungsprozesses nach myokardialer Ischämie zur Auflockerung und Degradation der Matrix im Infarktareal, so dass nekrotische Kardiomyozyten abtransportiert werden können. Dadurch bereiten MMPs die folgende fibrotische Phase vor [24]. Gleichzeitig wird die dritte, pro-fibrotische Phase durch MMPs initiiert. Ursächlich dafür ist, dass die Anwesenheit von MMP-9 zu einer vermehrten Aktivierung von TGF- $\beta$  führt, welches dann die Proliferation und Differenzierung von Fibroblasten induzieren kann [53, 72].

Zudem lässt sich aus diesen Zusammenhängen erneut eine Perspektive für therapeutische Interventionen eruieren: Einer Herzinsuffizienz durch systolische Dysfunktion nach myokardialer Ischämie liegt häufig eine übermäßige kardiale Fibrose zugrunde. Da C0-C1f via MMP-9 und IL-32 an diesem maladaptiven Remodeling beteiligt sein könnte, ist eine Inhibition von C0-C1f oder der zugrundeliegenden Signalwege potenziell protektiv. Limitierend ist jedoch, dass Studien gezeigt haben, dass MMPs auch einen positiven Einfluss auf das Überleben nach einem Myokardinfarkt haben [99]. Insbesondere ist in diesem Zusammenhang zu erwähnen, dass vor allem MMP-2 und MMP-9 durch die Spaltung von Chemokinen eine überschießende Entzündungsreaktion verhindern und somit anti-inflammatorisch wirken können [147]. Folglich könnte dies im Sinne eines negativen *Feedback Loops* zu einer Abschwächung der durch C0-C1f induzierten Inflammation führen. Eine abschließende Klärung, ob eine Induktion oder Inhibition von MMP-9 maladaptives Remodeling mit verminderter linksventrikulärer Funktion nach myokardialer Ischämie vermindert, ist somit derzeit nicht möglich [54].

Bei längerfristiger Stimulation von Fibroblasten mit C0-C1f kann der Übergang in die reparative Phase des Heilungsprozesses nicht nur über die MMPs, sondern auch direkt mit der Aktivierung der Kollagensynthese eingeleitet werden [24, 31]. Dies steht im direkten Zusammenhang mit dem *Interleukin 4 induced 1*, welches auf genetischer Ebene stark durch C0-C1f induziert wird, da Interleukin 4 einer der zentralen Regulatoren der Kollagensynthese in Fibroblasten ist [96].

Neben der Inflammation und dem vollständigen Abbau nekrotischer Kardiomyozyten ist eine adäquate Fibrosierung und Narbenbildung essenziell. Da Fibroblasten maßgeblich an der Fibrosierung beteiligt sind, ist das Überleben von Fibroblasten in dem hypoxischen und inflammatorischen Areal wesentlich [24, 40]. In diesem Zusammenhang kann C0-

C1f dazu beitragen, dass Fibroblasten die Ischämie sowie die starke Inflammation vermehrt überleben, da unter anderem *BIRC3* (synonym *cellular inhibitor of apoptosis 2*) induziert wird. Bei *BIRC3* handelt es sich um ein anti-apoptotisches Gen [116]. Mit Hilfe dieser Genregulation kann C0-C1f somit die Etablierung des zuvor erwähnten *pro-survival* Phänotyps von Fibroblasten unterstützen [24]. Dadurch wird die Depletion von Fibroblasten vermindert, so dass diese nach Abschluss der inflammatorischen Phase durch die Produktion von extrazellulärer Matrix und Differenzierung zu Myofibroblasten eine adäquate Narbe bilden können.

Trotz der Studien von Meng et al. war weiterhin unklar, welche Rolle C0-C1f hat – ist C0-C1f eine direkte und kausale Ursache für die Fibrose oder führen andere Abläufe in den transgenen Mäusen zu der beobachteten kardialen Fibrose [97, 98]? Mittels transgener Mäuse konnten Meng und Kollegen lediglich zeigen, dass die mehrwöchige Überexpression von C0-C1f zu vermehrter Fibrose sowie kardialer Dysfunktion führt [97, 98]. Es konnten jedoch keine genauen pathophysiologischen Mechanismen, die zu der Aktivierung von Fibroblasten führen, aufgedeckt und in direkten Zusammenhang mit C0-C1f gebracht werden [97, 98]. In dieser Arbeit konnte anhand primärer kardialer Fibroblasten sowie einer Fibroblasten-Zelllinie gezeigt werden, dass C0-C1f zu keiner Transdifferenzierung von Fibroblasten und somit Fibrose bei bis zu 48-stündiger Stimulation führt. Gegenteilig führte C0-C1f zu einer starken Reduzierung der *ACVR1C* mRNA Expression. Hierbei handelt es sich um einen der TGF- $\beta$  Rezeptoren [13]. Interessanterweise konnte *in-vitro* gezeigt werden, dass eine Herunterregulation des *ACVR1C* sowohl mit einer Hypertrophie der Kardiomyozyten als auch mit einer vermehrten Kollagen-Ablagerung einhergeht [51]. Dies führte *in-vivo* (*ACVR1C*<sup>-/-</sup> Mäuse) zu einer Dilatation des linken Ventrikels sowie zu einer geringeren Ejektionsfraktion und geringeren Kontraktilität des linken Ventrikels [51]. Diese Beobachtungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass C0-C1f indirekt via *ACVR1C* Inhibition in Fibroblasten, aber potenziell auch in Kardiomyozyten, zur linksventrikulären Maladaptation führen könnte. Wiederum könnte eine Inhibition von C0-C1f somit möglicherweise therapeutisch zur Verbesserung der Symptome sowie der Überlebensrate nach myokardialer Ischämie genutzt werden. Des Weiteren zeigte sich in den KEGG-Analysen eine starke Inhibition von *SMAD7*. Zum einen ist bekannt, dass *SMAD7* einen Cross-Link zwischen TGF- $\beta$  Signalwegen und NF $\kappa$ B Signalwegen bildet und zu einer Inhibition der IL-1R/TLR abhängigen NF $\kappa$ B Aktivität führen kann [156].

Eine Minderung der SMAD7 Expression durch C0-C1f passt somit in den pro-inflammatorischen Kontext von C0-C1f. Bemerkenswerterweise konnte mit Hilfe von SMAD7<sup>-/-</sup> Mäusen *in-vivo* gezeigt werden, dass das Fehlen von SMAD7 mit linksventrikulärer Maladaptation (erhöhter linksventrikulärer Masse sowie eingeschränkter linksventrikulärer Ejektionsfraktion) einhergeht [152]. Tiefergreifende Analysen zeigten anschließend, dass das zuvor beschriebene kardiale Remodeling durch verstärkte kardiale Fibrose sowie Inflammation mit vermehrter IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  sowie Makrophagen Infiltration einhergeht [152]. Analoge Ergebnisse zeigten Fibroblasten nach C0-C1f Stimulation in dieser Arbeit. Auch wenn keine direkte Fibrose durch SMAD7 verursacht wird, ist bekannt, dass das Fehlen von SMAD7 in Mäusen zu einer verstärkten Induktion von Kollagen Typ 1 sowie  $\alpha$ SMA nach Angiotensin II Exposition führen kann [152]. Dieser Prozess kann die von Meng und Kollegen beobachtete Fibrose mehrere Wochen nach myokardialer Ischämie erklären [97]. Auch ein Einfluss der zuvor beschriebenen MMP-vermittelten Aktivierung von TGF- $\beta$  ist hierbei denkbar.

#### **Wechselseitige Beeinflussung von C0-C1f und TGF- $\beta$**

TGF- $\beta$  ist einer der potentesten Induktoren von Fibrose nach myokardialer Ischämie [47]. Daher wurde der Effekt von C0-C1f auf die Auswirkungen von TGF- $\beta$  auf Fibroblasten sowie der Einfluss von TGF- $\beta$  auf die Auswirkungen von C0-C1f auf Fibroblasten untersucht.

Ko-Stimulationsversuche zeigten, dass vor allem mehr *MMPs*, *IL-32*, *IL4-induced 1* sowie Chemokine induziert werden. Bezüglich der Inhibition von *Prostaglandin-D2 Receptor*, *VCAM* sowie *PDGF-D* wirkten C0-C1f und TGF- $\beta$  synergistisch. Die Inhibition von *VEGF-D* sowie des *TLR2* war bei der Stimulation mit C0-C1f und TGF- $\beta$  verringert. Da diese Gene, wie bereits diskutiert, einen enormen Einfluss auf das Remodeling haben, folgt die Schlussfolgerung, dass C0-C1f selbst in Anwesenheit von TGF- $\beta$  einen Einfluss auf das Geschehen nach myokardialer Ischämie haben könnte. Interessanterweise wurde jedoch die *CXCL-1* Induktion durch C0-C1f lediglich bei kurzen Stimulationsdauern durch TGF- $\beta$  potenziert. Bei längeren Stimulationsdauern nahm die *CXCL-1* Induktion im Vergleich zur Einzelstimulation mit C0-C1f jedoch deutlich ab, wodurch die Relevanz von C0-C1f zu späteren Zeitpunkten nach myokardialer Ischämie im Sinne einer Monozyten-/Makrophagen-Rekrutierung via CXCL-1 abnimmt. Dies entspricht der zuvor beschriebenen Physiologie nach einer



myokardialen Ischämie, da Inflammation insbesondere zu frühen Zeitpunkten relevant ist. Durch die TGF- $\beta$  vermittelte Verminderung der Inflammation und C0-C1f vermittelten Immunzellrekrutierung kann somit der Übergang in die fibrotische Phase zu späteren Zeitpunkten vermittelt werden. Die bereits bekannten Einflüsse von TGF- $\beta$  auf die Inflammation, wie beispielsweise die Deaktivierung von Makrophagen sowie Herunterregulation der TLR2 Expression, konnten in dieser Arbeit in Fibroblasten analog beobachtet werden [17, 93]. Konkordant zu den Beobachtungen mit TLR2-Inhibitoren führte die Ko-Stimulation mit TGF- $\beta$  und C0-C1f daher durch die Verminderung der TLR2 Expression initial zu einer verstärkten Freisetzung von Chemokinen. Die *IL-1 $\beta$*  Induktion durch C0-C1f wurde von TGF- $\beta$  bei längeren Stimulationszeiten jedoch vollkommen supprimiert.

C0-C1f hatte zudem einen wesentlichen Effekt auf den Einfluss von TGF- $\beta$  auf Fibroblasten: *ACTA2* und *COL1* wurden in den Ko-Stimulationsversuchen in tendenziell geringerer Menge induziert. Dies steht im Einklang mit dem zuvor beschriebenen Einfluss inflammatorischer Zytokine auf die Fibrose. Die mRNA des *TGF- $\beta$ -R3* wurde nach TGF- $\beta$  Stimulation herunterreguliert. Dies entspricht einem negativen Feedbackmechanismus. C0-C1f potenzierte diese Supprimierung, so dass dies einem Einfluss von C0-C1f auf den TGF- $\beta$ -Signalweg entspricht und die beobachtete Supprimierung von *ACTA2*/ $\alpha$ SMA bei Ko-Stimulation untermauert. C0-C1f könnte somit eine verfrühte Fibrosierung nach myokardialer Ischämie inhibieren, da erst nach Abfall der C0-C1f Konzentration eine wesentliche Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten mit Narbenbildung möglich ist.

### **Rolle der TLR vermittelten Aktivierung von NF $\kappa$ B durch C0-C1f**

Signalwegsanalysen zeigten, dass die initiale Induktion der Inflammation nach C0-C1f Stimulation extrazellulär über den TLR4 und intrazellulär über NF $\kappa$ B vermittelt wird. Da nur die TLR4-Inhibition bei längerfristiger Stimulation mit C0-C1f eine signifikante Reduktion von Chemokinen zeigte, lässt sich postulieren, dass die extrazelluläre Interaktion von C0-C1f mit Fibroblasten vornehmlich über den TLR4 stattfindet. Nach Stimulation dieses Rezeptors werden jedoch verschiedene intrinsische Signalkaskaden aktiviert, so dass die Inhibitionen einzelner intrazellulärer Mediatoren (wie beispielsweise NF $\kappa$ B) bei 24-stündiger Stimulation zu keiner signifikanten Reduktion der Chemokin-Expression führen. Dies führt zu der Hypothese, dass durch C0-C1f Signalwege

unabhängig von NF $\kappa$ B aktiviert werden, die zu späteren Zeitpunkten Effekte zeigen. Analog zu unseren Ergebnissen erfolgte die Induktion von Makrophagen ebenfalls vor allem über den TLR4 und somit über die Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges [83].

Der TLR4-Signalweg spielt eine wichtige Rolle nach myokardialer Ischämie [73, 150]. *In-vivo* konnte gezeigt werden, dass die TLR4 Aktivierung nach myokardialer Ischämie zu erhöhten Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine führt [115]. Dies geht mit vergrößerten Infarktarealen aufgrund von verstärkter Apoptose, oxidativem Stress sowie Maladaptation des Herzens einher [115]. Nennenswert ist hierbei, dass eine kurzfristige Aktivierung des TLR nach myokardialer Ischämie mit einer reduzierten Infarktgröße einhergeht, so dass eine kurzzeitige Aktivierung des TLR4 gegebenenfalls sogar kardioprotektiv sein könnte [115]. Interessanterweise führte in Fibroblasten jedoch die Inhibition des TLR2 sowie RAGE nicht zu einer Verminderung, sondern zu einer vermehrten Induktion von *CXCL-1* nach sechsständiger Stimulation mit C0-C1f. Insbesondere die Aktivierung des MAP Kinase Signalweges in Fibroblasten trägt in dem frühen Stadium zur Aufrechterhaltung des pro-inflammatorischen Signalweges bei [115]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass C0-C1f zur Aktivierung dieses Signalweges in Fibroblasten führt. Luo et al. wiesen in einem Myokardinfarktmodell nach, dass nach fünfminütiger TGF- $\beta$  Exposition die maximale Phosphorylierung von ERK vorhanden ist, welche nach 30 Minuten bereits nicht mehr signifikant ist [85]. Analoge Ergebnisse zeigten unsere Signalwegsanalysen nach Stimulation mit TGF- $\beta$ . Zusätzlich zeigte C0-C1f eine deutliche Induktion des ERK Signalweges. Da die Aktivierung des ERK Signalweges zu vermehrter Expression von  $\alpha$ SMA, COL1 sowie MMP-9 führen kann, könnte dies gegebenenfalls die von Meng und Kollegen beobachtete kardiale Fibrosierung nach mehrwöchiger C0-C1f Exposition erklären [85]. Vor allem erklärt dies jedoch die beobachtete pro-inflammatorische Antwort nach C0-C1f Stimulation.

### **Einordnung von C0-C1f in den Heilungsprozess nach myokardialer Ischämie**

Die Funktion von C0-C1f lässt sich somit größtenteils, passend zu der postulierten Freisetzungskinetik des C0-C1f, der initialen Phase des Heilungsprozesses zuordnen (Abbildung 3) [87]. Diese Phase ist vor allem durch eine adäquate inflammatorische Antwort auf die myokardiale Ischämie und Zellnekrose gekennzeichnet und ist somit essenziell für ein adaptives Remodeling [31, 32, 109]. Da der Grad der Inflammation nach myokardialer Ischämie entscheidet, ob ein adäquater Heilungsprozess oder aber

maladaptives Remodeling mit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz eintritt, ist neben der direkten inflammatorischen Antwort via Zytokine auch die indirekte Antwort durch Induktion pro-inflammatorischer Chemokine eine wichtige Eigenschaft des C0-C1f [31, 109]. Somit ist C0-C1f als Regulator dieser akuten inflammatorischen Prozesse ein geeignetes Ziel für künftige therapeutische Interventionen. Außerdem lässt sich postulieren, dass C0-C1f initial als regulatorisches Pendant zu TGF- $\beta$  als Suppressor der kardialen Fibrose fungieren könnte.

### **Relevanz von C0-C1f als zukünftiges therapeutisches Ziel**

Durch die Erforschung der Funktionen von C0-C1f mittels transgener Mäuse konnte gezeigt werden, dass eine langfristige C0-C1f Exposition weitreichende Konsequenzen hat. C0-C1f führte in diesem Zusammenhang zur Entwicklung von Kardiomyopathien sowie Fibrose [97, 98]. Limitierend ist jedoch, dass eine Überexpression von C0-C1f sehr selten ist und daher die Situation nach einem akuten Myokardinfarkt nicht widerspiegelt. Die in dieser Arbeit untersuchte kurzfristige Stimulation von Fibroblasten mit C0-C1f zeigte gegenteilige Effekte, da keine Fibrose induziert wurde. Im Gegenteil forcierten die Effekte vielmehr pro-inflammatorische Antworten.

Die ubiquitäre Inhibition von inflammatorischen Signalwegen ist kein optimaler Therapieansatz, da mit vielseitigen Nebenwirkungen zu rechnen ist. Dies führte zu Überlegungen, der Inflammation zugrundeliegende Signalwege zu erforschen, um somit weitere Möglichkeiten zu entwickeln, anti-inflammatorisch eingreifen zu können [2]. Hierbei ist es von besonderer Relevanz, nicht nur die Produkte der Inflammation, wie beispielweise das IL-1 $\beta$ , sondern weiter *upstream* bereits die Induktion der Inflammation zu begreifen [3, 119-122]. Da C0-C1f in der frühen Phase nach einem Myokardinfarkt eine Rolle spielt und TNF- $\alpha$ , Chemokine, MMPs sowie inflammatorische Zytokine in Fibroblasten sowie Monozyten/Makrophagen induziert, ist der Fokus auf dieses Peptid (C0-C1f) als spezifisches und insbesondere kausales Ziel in der frühen Ischämie-/Reperfusionphase vielversprechend.

C0-C1f kommt physiologisch nicht vor, so dass eine nebenwirkungsarme Intervention bei direktem Fokus auf C0-C1f möglich ist. In dieser Arbeit konnten hierfür verschiedene Möglichkeiten zur Inhibition und Induktion der Effekte von C0-C1f als potenzielle therapeutische Optionen aufgezeigt werden.

### 4.3 Limitationen

Die Ergebnisse des grundlagenwissenschaftlichen Teils dieser Arbeit sind lediglich limitiert auf die Klinik übertragbar.

Methodisch limitierend ist, dass die Depletion von cMyBP-C via Western Blot und ELISA lediglich grob charakterisiert wurde. Wenngleich die Funktionalität der Depletion bestätigt werden konnte, ist eine Restkontamination mit cMyBP-C in depletierten Proben zum aktuellen Zeitpunkt nicht gänzlich auszuschließen. Für die Evaluation von C0-C1f als Biomarker muss die hier entwickelte Depletionsmethode beispielsweise mittels Massenspektrometrie genauer charakterisiert werden. Aufgrund der im direkten Vergleich hohen LLOD des in dieser Arbeit verwendeten cMyBP-C ELISA Kits, sind weitere Untersuchungen mit hochsensitiven Messmethoden wie der von Merck Millipore notwendig.

Außerdem wurden die Daten bezüglich des Einflusses von C0-C1f auf Fibroblasten nicht auf primären humanen kardialen Fibroblasten validiert. Auch wenn die Untersuchungen keine Unterschiede zwischen murinen kardialen Fibroblasten und humanen Vorhaut-Fibroblasten zeigten, ist dies ebenfalls nicht gänzlich auszuschließen. In die zugrundeliegenden Signalwege wurde durch ubiquitär wirkende Inhibitoren, wie TLR4 oder NF $\kappa$ B Inhibitoren, eingegriffen. Da das Verwenden dieser Inhibitoren aufgrund von Nebenwirkungen weder im Tiermodell noch klinisch umsetzbar ist, sind weitere Methoden zum Eingreifen in diese Signalwege essenziell.

#### 4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde eine Nachweismethode für C0-C1f auf Grundlage eines kommerziellen ELISAs für cMyBP-C entwickelt. Derartige Messverfahren für cMyBP-C sind gleichzeitig von anderen Arbeitsgruppen etabliert worden. Dennoch war keines dieser Verfahren geeignet, spezifisch C0-C1f zu messen. Der Versuch, einen spezifischen Antikörper gegen humanes C0-C1f zu entwickeln, war aufgrund der Homologie zum cMyBP-C voller Länge nicht möglich. Daher konnte auch kein spezifischer ELISA mit dem in Kooperation mit ProSci entwickelten Antikörper gegen C0-C1f entwickelt werden. Dennoch kann mit Hilfe des in dieser Arbeit etablierten Depletionsverfahrens – in Kombination mit dem hier verwendeten ELISA oder anderen sensitiveren Verfahren wie dem Singulex Assay von Merck Millipore – C0-C1f gemessen werden. Dadurch kann künftig die Relevanz von C0-C1f in Menschen evaluiert werden.

Da die Produkte der durch C0-C1f aktivierten Signalwege (IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCLs) sowie klinische Korrelate einer Herzinsuffizienz, Inflammation und Fibrose durch Laborparameter (CRP), echokardiographische Untersuchungen (diastolische und systolische Dysfunktion) sowie durch MRT Aufnahmen evaluiert werden können, kann künftig in Kombination mit der in dieser Arbeit entwickelten Detektionsmethode für C0-C1f die Relevanz der Modulation der C0-C1f Konzentration nach myokardialer Ischämie evaluiert werden. Die Modulation der C0-C1f Konzentration könnte durch dessen zentrale Rolle in inflammatorischen und fibrotischen Prozessen einen wichtigen Beitrag zur Verbesserung der Folgen eines Myokardinfarktes leisten.

Zusammengefasst moduliert C0-C1f die inflammatorischen Phasen des Heilungsprozesses nach einem Myokardinfarkt (Abbildung 3). Die fibrotische Phase wird durch C0-C1f hingegen inhibiert. Insbesondere die Tatsache, dass C0-C1f im Gegensatz zu anderen Biomarkern, wie beispielsweise den Troponinen, aktiv durch  $\mu$ -Calpain gespalten und freigesetzt wird, legt nahe, dass die Effekte durch C0-C1f nicht artifizieller Natur sind. C0-C1f aktiviert Fibroblasten über den TLR4, wodurch es zur Induktion von Chemokinen sowie inflammatorischen Zytokinen kommt. Außerdem zeigte sich eine Inhibition der TGF- $\beta$ -getriggerten Fibrose durch C0-C1f. Es handelt sich bei C0-C1f somit am ehesten um ein DAMP. Da C0-C1f sehr früh im Rahmen eines Myokardinfarktes freigesetzt wird, ist naheliegend, dass C0-C1f einen wesentlichen Einfluss auf die Inflammation sowie Vorbereitung des Remodelings nach myokardialer

Ischämie durch Auflockern von Gewebe durch MMPs, die Induktion der Chemotaxis und das Verhindern einer verfrühten, irreversiblen Fibrose hat. C0-C1f ist somit wesentlich für eine physiologische Reparatur (Abbildung 3) sowie das Timing der Inflammation und Fibrose während der verschiedenen Phasen des Heilungsprozesses nach einem Myokardinfarkt. Es kann somit postuliert werden, dass durch die Inhibition von C0-C1f oder dessen Signalwege und Produkte via Regulation des Geschehens nach myokardialer Ischämie ein kardioprotektiver Einfluss auf das Remodeling ausgeübt werden könnte. Derartige Modulationen konnten in dieser Arbeit mittels konventioneller Inhibitoren bewerkstelligt werden. Durch das entwickelte Depletionsverfahren konnte die Relevanz dieser Beobachtungen für die Klinik verifiziert werden, da es sich nach aktuellem Kenntnisstand bei einem großen Anteil des freigesetzten cMyBP-C um C0-C1f handeln könnte.

Therapeutisch kann zukünftig beispielsweise durch miRNAs (unter anderem miRNA-21, miRNA-146) in den Signalweg eingegriffen werden. Durch Binden dieser miRNAs an die sogenannten UTR (*untranslated region*) der mRNAs von Proteinen, die unter anderem nach TLR4 Aktivierung freigesetzt werden, kommt es zu einer vermehrten Degradation dieser mRNAs. Dementsprechend ist ein verminderter Effekt der TLR4 Aktivierung die Folge. Der Nutzen dieser eleganten Methode zur Inhibition der Freisetzung von Proteinen wird derzeit stark beforscht und ist bereits durch die FDA in klinischen Studien zugelassen [48]. Des Weiteren besteht durch das Beladen von extrazellulären Vesikeln mit diesen miRNAs die Möglichkeit, noch organspezifischer und damit gezielter miRNAs zu transportieren [112]. Durch das Verschmelzen der extrazellulären Vesikel mit der Membran der Zielzellen ist außerdem gewährleistet, dass eine möglichst große Menge der miRNA in die Zelle und damit an ihren Wirkort gelangt. Dies vermindert das Risiko von potenziellen Nebenwirkungen durch unspezifisches Degradieren von mRNAs durch im Blut zirkulierende miRNAs. Daher vermag diese zellfreie Behandlungsmöglichkeit zukünftig eine vielversprechende, komplementäre therapeutische Strategie zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen sein [34]. Weitere Forschungsarbeiten in diese Richtung zur Beeinflussung von C0-C1f bzw. dessen Effekte werden derzeit von unserer Arbeitsgruppe geplant.

## 5. Zusammenfassung

### 5.1 Zusammenfassung (Deutsch)

#### Einleitung

Das kardiale Myosin-bindende Protein-C (cMyBP-C) ist ein Strukturprotein, das in Kardiomyozyten exprimiert wird und kürzlich als neuer Biomarker für die myokardiale Ischämie beschrieben wurde. Dessen N-terminales Fragment, C0-C1f, wird innerhalb der ersten Minuten nach myokardialer Ischämie durch  $\mu$ -Calpain-abhängige Spaltung von cMyBP-C freigesetzt und spielt eine entscheidende Rolle bei der Initiierung von Inflammation in Makrophagen. Langfristige C0-C1f-Exposition induziert bei transgenen Mäusen eine kardiale Fibrose; der Mechanismus, durch den C0-C1f die Fibrose verursacht, ist jedoch unklar. Das Ziel dieser Studie war es, die Relevanz von C0-C1f nach myokardialer Ischämie und seine Auswirkungen auf Fibroblasten zu untersuchen.

#### Methoden

Es wurde ein *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) zur Detektion von C0-C1f etabliert. Hierfür wurde der cMyBP-C Quantifizierung eine Depletion vorangeschaltet, so dass spezifisch C0-C1f gemessen werden konnte. Darüber hinaus wurde der Einfluss von C0-C1f auf das Transkriptom von murinen kardialen sowie humanen Fibroblasten analysiert. Dazu wurden primäre murine kardiale Fibroblasten sowie eine humane Fibroblasten-Zelllinie (huFib) über unterschiedliche Zeiträume mit C0-C1f behandelt. Inflammatorische und fibrotische Reaktionen wurden auf mRNA- und Proteinebene mit verschiedenen Techniken bewertet, darunter Microarray, RT-qPCR, Western Blotting sowie immunhistochemische Färbungen. Die zugrunde liegenden Signalwege wurden durch KEGG-Analysen, Western Blots sowie mittels konventioneller Inhibitoren analysiert.

#### Ergebnisse

Bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom scheinen 40 % des freigesetzten cMyBP-C C0-C1f zu sein. Folglich wurde der Einfluss von C0-C1f auf Fibroblasten untersucht. C0-C1f induzierte überwiegend pro-inflammatorische Reaktionen in murinen und humanen Fibroblasten. C0-C1f verursachte jedoch keine Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten mit erhöhtem intrazellulärem ACTA2/ $\alpha$ SMA. KEGG-

Analysen und Western Blots zeigten, dass C0-C1f hauptsächlich den TLR4/NFκB-Signalweg aktiviert. Dementsprechend induzierte C0-C1f die Phosphorylierung von ERK1/2, aber eine Aktivierung des SMAD-Signalwegs durch C0-C1f wurde nicht beobachtet. Die Hemmung von TLR4 oder NFκB führte zu einer signifikant geringeren Induktion von Zytokinen und Chemokinen.

### **Fazit**

C0-C1f wird nach myokardialer Ischämie bei Patienten mit einem ACS freigesetzt. *In vitro* induziert C0-C1f über den MAPK/ERK und NFκB Signalweg Inflammation in Fibroblasten, während der pro-fibrotische TGF-β/SMAD-Signalweg nicht aktiviert wird. Die Aktivierung von ERK1/2 durch C0-C1f gibt erste Hinweise auf den Regulationsmechanismus. Eine direkte Wirkung von C0-C1f auf Fibroblasten, die zur Differenzierung in Myofibroblasten führt, wurde jedoch nicht beobachtet. Zusammengefasst stimmen diese Daten mit der Hypothese überein, dass C0-C1f auch in Fibroblasten eine Schlüsselrolle bei der Initiierung von Inflammation nach einer myokardialen Ischämie spielt. C0-C1f könnte zur kardialen Fibrose beitragen, indem es zu späteren Zeitpunkten weitere Zellen, wie beispielsweise Makrophagen, aktiviert.



## 5.2 Abstract (English)

### Introduction and Purpose

Cardiac myosin binding protein-C (cMyBP-C) is a structural protein expressed in the thick filament backbone of cardiomyocytes and was recently described as a novel biomarker for myocardial ischemia. Its N-terminal fragment, C0-C1f, is released within the first minutes of myocardial ischemia by  $\mu$ -Calpain depended cleavage of cMyBP-C and plays a crucial role in the initiation of inflammation in bone marrow-derived macrophages. Long-term C0-C1f exposure induces cardiac fibrosis in transgenic mice; however, the mechanism by which C0-C1f may cause fibrosis is unclear. The aim of this study was to investigate the relevance of C0-C1f after myocardial ischemia and its effects on fibroblasts, which are the main contributor to fibrosis.

### Methods

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of C0-C1f was established. In this occasion, a prefixed depletion was used to evaluate C0-C1f levels in patients with acute coronary syndrome. Moreover, we analyzed the impact of C0-C1f on the transcriptome of murine cardiac as well as human fibroblasts. For this, primary murine cardiac fibroblasts as well as a novel human fibroblast cell line were treated with C0-C1f for different time periods. Inflammatory and fibrotic responses were evaluated at mRNA and protein level using different techniques including microarray, RT-qPCR, western blotting as well as immunofluorescence staining. Underlying pathways were analyzed by KEGG-analyses, western blotting as well as inhibiting pathways *in-vitro*.

### Results

In patients with acute coronary syndrome, 40 % of the released cMyBP-C seems to be C0-C1f. Consequently, we evaluated pathogenic properties of C0-C1f on fibroblasts. C0-C1f predominantly induced pro-inflammatory responses in murine and human fibroblasts. However, C0-C1f did not cause differentiation of fibroblasts to myofibroblasts with increased intracellular levels of *ACTA2*/ $\alpha$ SMA. KEGG analyses and western blotting revealed that C0-C1f mainly activates TLR4/NF $\kappa$ B pathways. In line, C0-C1f induced the phosphorylation of ERK1/2, but activation of the SMAD signaling pathway by C0-C1f was not observed. Inhibition of TLR4 or NF $\kappa$ B led to significantly lower upregulation of cytokines and chemokines.

## **Conclusion**

C0-C1f is released after myocardial ischemia in patients with acute coronary syndrome. *In-vitro*, C0-C1f induces inflammation in fibroblasts via the MAPK/ERK pathway, whereas it does not activate the pro-fibrotic TGF- $\beta$ /SMAD pathway. Activation of ERK1/2 by C0-C1f gives the first indication of this regulatory mechanism. However, a direct effect of C0-C1f on fibroblasts leading to differentiation into myofibroblasts was not observed. Taken together, these data are consistent with the hypothesis that C0-C1f might play a key role in the early initiation of inflammation upon myocardial infarction, also in fibroblasts, and might contribute to cardiac fibrosis by activating other cells, such as macrophages, at later stages.

**6. Abkürzungsverzeichnis**

a.e.....	am ehesten
ACE.....	Angiotensinkonversionsenzym
ACS.....	Akute Koronarsyndrom
Agtr1.....	Angiotensin II Rezeptor Typ I
ANOVA.....	Varianzanalyse
BIRC3.....	Baculoviral IAP repeat-containing protein 3
C0-L.....	C0-Linker
CCL-2.....	CC-Chemokin Ligand 2
CCR-2.....	CCL-2 Rezeptor
CCS.....	Chronisches Koronarsyndrom
CK.....	Kreatinkinase
cMyBP-C.....	Kardiales Myosin-bindende Protein C
CRP.....	C-Reaktive Protein
CXCL.....	C-X-C Motiv Ligand
DAMP.....	Danger-Associated Molecular Pattern
DCM.....	Dilatative Kardiomyopathie
ELISA.....	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EZM.....	Extrazelluläre Matrix
FDA.....	Food and Drug Administration
GAPDH.....	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
hC0-C1f.....	Humanes C0-C1f
HCM.....	Hypertrophe Kardiomyopathie
HMGB1.....	High-Mobility-Group Protein B1
huFib.....	Humane Fibroblasten-Zelllinie
IF.....	Immunhistochemische Färbung
IL-10.....	Interleukin 10
IL-1 $\alpha$ .....	Interleukin 1 Alpha
IL-1 $\beta$ .....	Interleukin 1 Beta
IL-32.....	Interleukin 32
IL-6.....	Interleukin 6
LDH.....	Laktatdehydrogenase
LLOD.....	Lower Limit of Detection

## 6. Abkürzungsverzeichnis

LPS .....	Lipopolysaccharid
mC0-C1 .....	Murines C0-C1
mC0-C1f .....	Murines C0-C1f
mC0-C2 .....	Murines C0-C2
mC0-L .....	Murines C0-Linker
MMP .....	Matrix-Metalloproteasen
MYBPC1 .....	Myosin-bindende Protein C 1 (Gen)
MYBPC2 .....	Myosin-bindende Protein C 2 (Gen)
MYBPC3 .....	Myosin-bindende Protein C 3 (Gen)
NSTEMI .....	Nicht-ST-Hebungsinfarkt
PAMP .....	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PCI .....	Perkutane Koronarintervention
PRR .....	Pattern Recognition Rezeptor
PTCA .....	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
RAGE .....	Receptor for Advanced Glycation Endproduct
SOL .....	Musculus soleus
STEMI .....	ST-Hebungsinfarkt
TA .....	Musculus tibialis anterior
TASH .....	Transkorane Ablation der Septumhypertrophie
TGF- $\beta$ .....	Transforming Growth Factor Beta
TLR .....	Toll-Like Rezeptor
TNF- $\alpha$ .....	Tumornekrosefaktor Alpha
TnT .....	Troponin T
UTR .....	Untranslated Region
VEGF .....	Vascular Endothelial Growth Factor
$\alpha$ SMA .....	Alpha Smooth Muscle Actin

## 7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kardiale Myosin-bindende Protein C und dessen Interaktionsstellen mit Myosin, Aktin sowie Titin.....	1
Abbildung 2: cMyBP-C und dessen N-terminales Fragment C0-C1f.....	4
Abbildung 3: Heilungsprozess nach einem Myokardinfarkt .....	6
Abbildung 4: Funktion von Fibroblasten im Rahmen einer myokardialen Ischämie .....	7
Abbildung 5: Einfluss von DAMPs auf Fibroblasten und weitere Zelltypen.....	8
Abbildung 6: Schematische Zusammenfassung der inflammatorischen Signalwege in Fibroblasten.....	9
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Depletion von cMyBP-C Fragmenten länger als C0-C1f mit Hilfe an magnetische Beads gekoppelter Antikörper .....	24
Abbildung 8: Schematische Darstellung von cMyBP-C und dessen N-terminalen Fragmente .....	27
Abbildung 9: Kalibrierungskurve des Quanterix TNF- $\alpha$ Assays.....	28
Abbildung 10: Charakterisierung der verwendeten Antikörper mittels Western Blot sowie immunhistochemischer Färbungen.....	33
Abbildung 11: Western Blot von murinem Herzlysate, Biopsien des M. tibialis anterior und M. soleus mittels H8 .....	34
Abbildung 12: Bindungsstellen der Antikörper E7, H8 sowie I1. ....	34
Abbildung 13: cMyBP-C Konzentration in ACS Patienten .....	35
Abbildung 14: Depletion von cMyBP-C mittels I1.....	36
Abbildung 15: Morphologischer Vergleich der angewandten Isolationsmethoden.....	37
Abbildung 16: Immunhistochemische Färbungen muriner kardialer Fibroblasten .....	38
Abbildung 17: CD68 Färbung muriner kardialer Fibroblasten.....	38
Abbildung 18: Acta2 Genregulation nach 24-stündiger Stimulation mit TGF- $\beta$ in Abhängigkeit von der Isolationsmethode .....	39

Abbildung 19: Induktion pro-inflammatorischer Zytokine nach sechsstündiger Stimulation von murinen kardialen Fibroblasten mit mC0-C1f, TGF- $\beta$ sowie LPS .....	40
Abbildung 20: Beeinflussung von Mmp-9 nach sechsstündiger Stimulation von murinen kardialen Fibroblasten mit mC0-C1f, LPS und TGF- $\beta$ .....	41
Abbildung 21: Regulation der Gene für Il-1 $\beta$ , Agtr1, Mmp-9 und Acta2 nach 48-stündiger Stimulation von murinen kardialen Fibroblasten mit mC0-C1f, TGF- $\beta$ und LPS .....	42
Abbildung 22: TNF- $\alpha$ Freisetzung nach (A) sechsstündiger und (B) 48-stündiger Stimulation mit mC0-C1f, LPS und TGF- $\beta$ .....	43
Abbildung 23: Repräsentativer Western Blot für COL1 nach 48-stündiger Stimulation von murinen kardialen Fibroblasten mit TGF- $\beta$ , mC0-C1f und LPS.....	44
Abbildung 24: Einfluss von TGF- $\beta$ , hC0-C1f, LPS und C0-L auf inflammatorische und fibrotische Gene in humanen Fibroblasten .....	45
Abbildung 25: Volcano-Plot der am stärksten durch (A) hC0-C1f und (B) C0-L beeinflussten Gene .....	46
Abbildung 26: Aktivierung von humanen Fibroblasten nach 24-stündiger Stimulation mit hC0-C1f, C0-Linker, LPS sowie TGF- $\beta$ .....	47
Abbildung 27: Zeitlicher Verlauf der Chemokin- und Zytokin mRNA Beeinflussung nach Stimulation von humanen Fibroblasten mit TGF- $\beta$ , hC0-C1f, LPS und C0-L für vier, sechs, zwölf, 24 sowie 48 Stunden.....	50
Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf der MMP-9 und TLR2 mRNA Beeinflussung nach Stimulation von humanen Fibroblasten mit TGF- $\beta$ , hC0-C1f, LPS und C0-L für vier, sechs, zwölf, 24 sowie 48 Stunden.....	51
Abbildung 29: $\alpha$ SMA Färbung nach 48-stündiger Stimulation der humanen Fibroblasten.....	52
Abbildung 30: Beeinflussung von ACTA2/ $\alpha$ SMA nach 48-stündiger Stimulation mit hC0-C1f, TGF- $\beta$ und LPS.....	53
Abbildung 31: (A) Repräsentativer Western Blot für COL1 sowie (B) Quantifikation der Western Blots nach Stimulation mit TGF- $\beta$ , hC0-C1f sowie LPS .....	54

Abbildung 32: Einfluss von Endotoxinen auf die hC0-C1f vermittelte Induktion von Chemokinen, MMP-9 sowie ICAM-1 .....	56
Abbildung 33: Zeitlicher Verlauf von (A) CXCL-1, (B) CCL-2, (C) MMP-9, (D) IL-32 und (E) IL-1 $\beta$ bei simultaner Stimulation der humanen Fibroblasten mit hC0-C1f und TGF- $\beta$ .....	59
Abbildung 34: Einfluss der Ko-Stimulation mit TGF- $\beta$ und hC0-C1f auf ACTA2 und COL1A1.....	60
Abbildung 35: $\alpha$ SMA Färbung nach 48-stündiger Stimulation der humanen Fibroblasten mit TGF- $\beta$ und hC0-C1f.....	61
Abbildung 36: Einfluss der Ko-Stimulation mit hC0-C1f und TGF- $\beta$ auf die Expression des TLR2 in humanen Fibroblasten .....	62
Abbildung 37: Einfluss von hC0-C1f auf verschiedene Signalwege in Fibroblasten (KEGG Analyse).....	63
Abbildung 38: Aufschlüsselung der Beeinflussung des NF $\kappa$ B Signalweges durch hC0-C1f (KEGG Analyse).....	64
Abbildung 39: Aufschlüsselung der Beeinflussung des TGF- $\beta$ Signalweges durch hC0-C1f (KEGG Analyse).....	65
Abbildung 40: Phosphorylierung von ERK und SMAD3 durch TGF- $\beta$ , hC0-C1f und LPS nach fünf Minuten, 15 Minuten und 60 Minuten .....	65
Abbildung 41: Inhibition des TLR4 und NF $\kappa$ B Signalweges mittels kommerzieller Inhibitoren.....	67
Abbildung 42: Inhibition von RAGE und TLR2 mittels konventioneller Inhibitoren...	68
Abbildung 43: Einfluss der konventionellen Inhibitoren auf die CXCL-1 Expression nach 24-stündiger hC0-C1f Stimulation.....	69
Abbildung 44: C0-C1f aktiviert über TLR4 den MAP-Kinase Signalweg in Fibroblasten.....	74

**7.2 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Verwendete Versuchstiere..... 13

Tabelle 2: Verwendete Materialien in der Zellkultur..... 13

Tabelle 3: Materialien für den allgemeinen Laborbedarf..... 14

Tabelle 4: Verwendete Geräte..... 15

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien..... 17

Tabelle 6: Verwendete Kits und Assays..... 17

Tabelle 7: Verwendete Puffer und deren Zusammensetzung..... 19

Tabelle 8: Verwendete Software..... 19

Tabelle 9: Verwendete Antikörper für Western Blots..... 22

Tabelle 10: Verwendete Antikörper für immunhistochemische Färbungen..... 23

Tabelle 11: Verwendete Primer für RT-qPCR muriner Gene..... 29

Tabelle 12: Verwendete Primer für RT-qPCR humaner Gene..... 30

Tabelle 13: Genregulation nach Ko-Stimulation mit TGF- $\beta$  und hC0-C1f..... 57



## 8. Literaturverzeichnis

1. Indications for fibrinolytic therapy in suspected acute myocardial infarction: collaborative overview of early mortality and major morbidity results from all randomised trials of more than 1000 patients. Fibrinolytic Therapy Trialists' (FTT) Collaborative Group. *Lancet*, 1994. **343**(8893): p. 311-22.
2. Aday, A.W. and P.M. Ridker, Antiinflammatory Therapy in Clinical Care: The CANTOS Trial and Beyond. *Front Cardiovasc Med*, 2018. **5**: p. 62.
3. Aday, A.W. and P.M. Ridker, Targeting Residual Inflammatory Risk: A Shifting Paradigm for Atherosclerotic Disease. *Front Cardiovasc Med*, 2019. **6**: p. 16.
4. Albert, N.M. and C. Lewis, Recognizing and managing asymptomatic left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *Crit Care Nurse*, 2008. **28**(2): p. 20-37; quiz 38.
5. Ambrosioni, E., C. Borghi, and B. Magnani, The effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor zofenopril on mortality and morbidity after anterior myocardial infarction. The Survival of Myocardial Infarction Long-Term Evaluation (SMILE) Study Investigators. *N Engl J Med*, 1995. **332**(2): p. 80-5.
6. Anand, A., et al., Cardiac myosin-binding protein C is a novel marker of myocardial injury and fibrosis in aortic stenosis. *Heart*, 2018. **104**(13): p. 1101-1108.
7. assays, R.a. Human collagen Type I. Available from: [https://rockland-inc.com/store/Collagen-Proteins-009-001-103-O4L\\_23118.aspx](https://rockland-inc.com/store/Collagen-Proteins-009-001-103-O4L_23118.aspx).
8. Baker, J.O., et al., Cardiac myosin-binding protein C: a potential early biomarker of myocardial injury. *Basic research in cardiology*, 2015. **110**(3): p. 23.
9. Barefield, D. and S. Sadayappan, Phosphorylation and function of cardiac myosin binding protein-C in health and disease. *J Mol Cell Cardiol*, 2010. **48**(5): p. 866-75.
10. Barefield, D.Y., et al., Ablation of the calpain-targeted site in cardiac myosin binding protein-C is cardioprotective during ischemia-reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2019. **129**: p. 236-246.
11. Baum, J. and H.S. Duffy, Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about? *Journal of cardiovascular pharmacology*, 2011. **57**(4): p. 376–379.

12. Berezin, A.E. and A.A. Berezin, Adverse Cardiac Remodelling after Acute Myocardial Infarction: Old and New Biomarkers. *Dis Markers*, 2020. **2020**: p. 1215802.
13. Bertolino, P., et al., Activin B receptor ALK7 is a negative regulator of pancreatic beta-cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(20): p. 7246-51.
14. Bidzhekov, K., A. Zerneck, and C. Weber, MCP-1 induces a novel transcription factor with proapoptotic activity. *Circ Res*, 2006. **98**(9): p. 1107-9.
15. Boza, P., et al., Expression and function of toll-like receptor 4 and inflammasomes in cardiac fibroblasts and myofibroblasts: IL-1beta synthesis, secretion, and degradation. *Mol Immunol*, 2016. **74**: p. 96-105.
16. Brown, R.D., et al., Cytokines regulate matrix metalloproteinases and migration in cardiac fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007. **362**(1): p. 200-205.
17. Bujak, M. and N.G. Frangogiannis, The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res*, 2007. **74**(2): p. 184-95.
18. Burnette, W.N., "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 1981. **112**(2): p. 195-203.
19. Carrier, L., et al., Cardiac myosin-binding protein C (MYBPC3) in cardiac pathophysiology. *Gene*, 2015. **573**(2): p. 188–197.
20. Chacko, S., et al., The role of biomarkers in the diagnosis and risk stratification of acute coronary syndrome. *Future Sci OA*, 2018. **4**(1): p. FSO251.
21. Cleland, J.G., A. Torabi, and N.K. Khan, Epidemiology and management of heart failure and left ventricular systolic dysfunction in the aftermath of a myocardial infarction. *Heart*, 2005. **91 Suppl 2**: p. ii7-13; discussion ii31, ii43-8.
22. Collet, J.P., et al., 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J*, 2020.
23. Cooperstock, M.S., Inactivation of endotoxin by polymyxin B. *Antimicrob Agents Chemother*, 1974. **6**(4): p. 422-5.
24. Daseke, M.J., et al., Cardiac fibroblast activation during myocardial infarction wound healing. *Matrix Biology*, 2020.

25. de Kleijn, D. and G. Pasterkamp, Toll-like receptors in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*, 2003. **60**(1): p. 58-67.
26. De Luca, G., et al., Time delay to treatment and mortality in primary angioplasty for acute myocardial infarction: every minute of delay counts. *Circulation*, 2004. **109**(10): p. 1223-5.
27. Deshmane, S.L., et al., Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*, 2009. **29**(6): p. 313-26.
28. Dewald, O., et al., CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res*, 2005. **96**(8): p. 881-9.
29. Domanski, M.J., et al., Effect of angiotensin converting enzyme inhibition on sudden cardiac death in patients following acute myocardial infarction. A meta-analysis of randomized clinical trials. *J Am Coll Cardiol*, 1999. **33**(3): p. 598-604.
30. Fernandez, E.J. and E. Lolis, Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2002. **42**: p. 469-99.
31. Francis Stuart, S.D., et al., The crossroads of inflammation, fibrosis, and arrhythmia following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 2016. **91**: p. 114-22.
32. Frangogiannis, N.G. and M.L. Entman, Chemokines in myocardial ischemia. *Trends Cardiovasc Med*, 2005. **15**(5): p. 163-9.
33. Freisinger, E., et al., German nationwide data on current trends and management of acute myocardial infarction: discrepancies between trials and real-life. *Eur Heart J*, 2014. **35**(15): p. 979-88.
34. Galieva, L.R., et al., Therapeutic Potential of Extracellular Vesicles for the Treatment of Nerve Disorders. *Front Neurosci*, 2019. **13**: p. 163.
35. Gentleman, R.C., et al., *Genome Biology*, 2004. **5**(10).
36. Gong, T., et al., DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*, 2020. **20**(2): p. 95-112.
37. Gonzalvez, M., et al., [Prognostic value of tumor necrosis factor-alpha in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction]. *Rev Esp Cardiol*, 2007. **60**(12): p. 1233-41.
38. Govindan, S., et al., Increase in cardiac myosin binding protein-C plasma levels is a sensitive and cardiac-specific biomarker of myocardial infarction. *American journal of cardiovascular disease*, 2013. **3**(2): p. 60-70.

39. Govindan, S., et al., Increase in cardiac myosin binding protein-C plasma levels is a sensitive and cardiac-specific biomarker of myocardial infarction. *American Journal of Cardiovascular Disease*, 2013. **3**(2): p. 60–70.
40. Govindan, S., et al., Cardiac myosin binding protein-C is a potential diagnostic biomarker for myocardial infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2011. **52**(1): p. 154–164.
41. Govindan, S., et al., Cardiac myosin binding protein-C is a potential diagnostic biomarker for myocardial infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2012. **52**(1): p. 154–164.
42. Govindan, S., et al., Cardiac myosin binding protein-C is a potential diagnostic biomarker for myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 2012. **52**(1): p. 154-64.
43. Govindan, S., et al., Pathogenic properties of the N-terminal region of cardiac myosin binding protein-C in vitro. *J Muscle Res Cell Motil*, 2012. **33**(1): p. 17-30.
44. Govindan, S., et al., Pathogenic properties of the N-terminal region of cardiac myosin binding protein-C in vitro. *Journal of muscle research and cell motility*, 2012. **33**(1): p. 17–30.
45. Gunduz, D., C.W. Hamm, and M. Aslam, Simultaneous Isolation of High Quality Cardiomyocytes, Endothelial Cells, and Fibroblasts from an Adult Rat Heart. *J Vis Exp*, 2017(123).
46. Gutstein, D.E. and V. Fuster, Pathophysiology and clinical significance of atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovasc Res*, 1999. **41**(2): p. 323-33.
47. Hanna, A. and N.G. Frangogiannis, The Role of the TGF-beta Superfamily in Myocardial Infarction. *Front Cardiovasc Med*, 2019. **6**: p. 140.
48. Hanna, J., G.S. Hossain, and J. Kocerha, The Potential for microRNA Therapeutics and Clinical Research. *Front Genet*, 2019. **10**: p. 478.
49. Hartupee, J. and D.L. Mann, Role of inflammatory cells in fibroblast activation. *J Mol Cell Cardiol*, 2016. **93**: p. 143-8.
50. Hinderer, S. and K. Schenke-Layland, Cardiac fibrosis - A short review of causes and therapeutic strategies. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019. **146**: p. 77-82.
51. Huang, H., et al., ALK7 protects against pathological cardiac hypertrophy in mice. *Cardiovasc Res*, 2015. **108**(1): p. 50-61.
52. Ibanez, B., et al., 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for

- the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*, 2018. **39**(2): p. 119-177.
53. Iyer, R.P., M. Jung, and M.L. Lindsey, MMP-9 signaling in the left ventricle following myocardial infarction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2016. **311**(1): p. H190-H198.
  54. Iyer, R.P., M. Jung, and M.L. Lindsey, MMP-9 signaling in the left ventricle following myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016. **311**(1): p. H190-8.
  55. Jacobs, M., et al., Tumor necrosis factor-alpha at acute myocardial infarction in rats and effects on cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol*, 1999. **31**(11): p. 1949-59.
  56. Joosten, L.A., et al., Novel insights into the biology of interleukin-32. *Cell Mol Life Sci*, 2013. **70**(20): p. 3883-92.
  57. Kaier, T.E., B. Alaour, and M. Marber, Cardiac Myosin-Binding Protein C-From Bench to Improved Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2019. **33**(2): p. 221-230.
  58. Kaier, T.E., et al., Temporal Relationship between Cardiac Myosin-Binding Protein C and Cardiac Troponin I in Type 1 Myocardial Infarction. *Clin Chem*, 2016. **62**(8): p. 1153-5.
  59. Kaier, T.E., et al., FROM BENCH TO IMPROVED PRE-HOSPITAL DIAGNOSIS OF VERY EARLY AMI: CARDIAC MYOSIN-BINDING PROTEIN C. *Journal of the American College of Cardiology*, 2018. **71**(11): p. A2659.
  60. Kaier, T.E., et al., Cardiac Myosin-Binding Protein C to Diagnose Acute Myocardial Infarction in the Pre-Hospital Setting. *J Am Heart Assoc*, 2019. **8**(15): p. e013152.
  61. Kaier, T.E., et al., Direct Comparison of Cardiac Myosin-Binding Protein C With Cardiac Troponins for the Early Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. *Circulation*, 2017. **136**(16): p. 1495–1508.
  62. Kakio, T., et al., Roles and relationship of macrophages and monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in the ischemic and reperfused rat heart. *Lab Invest*, 2000. **80**(7): p. 1127-36.

63. Katus, H.A., et al., Diagnostic efficiency of troponin T measurements in acute myocardial infarction. *Circulation*, 1991. **83**(3): p. 902-12.
64. Kim, S.H., et al., Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNF $\alpha$ . *Immunity*, 2005. **22**(1): p. 131-42.
65. Knoll, R., Myosin binding protein C: implications for signal-transduction. *J Muscle Res Cell Motil*, 2012. **33**(1): p. 31-42.
66. Knuuti, J., et al., 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *Eur Heart J*, 2019.
67. Kochar, A., et al., Long-Term Mortality of Older Patients With Acute Myocardial Infarction Treated in US Clinical Practice. *J Am Heart Assoc*, 2018. **7**(13).
68. Krejci, J., et al., Inflammatory Cardiomyopathy: A Current View on the Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Biomed Res Int*, 2016. **2016**: p. 4087632.
69. Kuhn, H., et al., Transcoronary ablation of septal hypertrophy (TASH): a new treatment option for hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Z Kardiol*, 2000. **89 Suppl 4**: p. IV41-54.
70. Kumar, A.G., et al., Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in the small veins of the ischemic and reperfused canine myocardium. *Circulation*, 1997. **95**(3): p. 693-700.
71. Lafontant, P.J., et al., Oncostatin M differentially regulates CXC chemokines in mouse cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006. **291**(1): p. C18-26.
72. Lambert, J.M., E.F. Lopez, and M.L. Lindsey, Macrophage roles following myocardial infarction. *International Journal of Cardiology*, 2008. **130**(2): p. 147-158.
73. Lee, S.M., M. Hutchinson, and D.A. Saint, The role of Toll-like receptor 4 (TLR4) in cardiac ischaemic-reperfusion injury, cardioprotection and preconditioning. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2016. **43**(9): p. 864-71.
74. Libby, P., Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
75. Liebetrau, C., et al., Reference Values and Release Kinetics of B-Type Natriuretic Peptide Signal Peptide in Patients with Acute Myocardial Infarction. *Clin Chem*, 2015. **61**(12): p. 1532-9.
76. Liebetrau, C., et al., Release kinetics of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in a clinical model of acute myocardial infarction. *Clin Chim Acta*, 2014. **429**: p. 34-7.

77. Liebetrau, C., et al., Release kinetics of inflammatory biomarkers in a clinical model of acute myocardial infarction. *Circ Res*, 2015. **116**(5): p. 867-75.
78. Liebetrau, C., et al., Release kinetics of circulating muscle-enriched microRNAs in patients undergoing transcatheter ablation of septal hypertrophy. *J Am Coll Cardiol*, 2013. **62**(11): p. 992-8.
79. Liebetrau, C., et al., Release kinetics of cardiac biomarkers in patients undergoing transcatheter ablation of septal hypertrophy. *Clinical chemistry*, 2012. **58**(6): p. 1049–1054.
80. Liebetrau, C., et al., Release kinetics of copeptin in patients undergoing transcatheter ablation of septal hypertrophy. *Clin Chem*, 2013. **59**(3): p. 566-9.
81. Liebetrau, C., et al., Release kinetics of early ischaemic biomarkers in a clinical model of acute myocardial infarction. *Heart*, 2014. **100**(8): p. 652-7.
82. Liehn, E.A., et al., A new monocyte chemoattractant protein-1/chemokine CC motif ligand-2 competitor limiting neointima formation and myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *J Am Coll Cardiol*, 2010. **56**(22): p. 1847-57.
83. Lipps, C., et al., N-terminal fragment of cardiac myosin binding protein-C triggers pro-inflammatory responses in vitro. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2016. **99**: p. 47–56.
84. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
85. Luo, S., et al., ZYZ-168 alleviates cardiac fibrosis after myocardial infarction through inhibition of ERK1/2-dependent ROCK1 activation. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 43242.
86. Lynch, M.D. and F.M. Watt, Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. *J Clin Invest*, 2018. **128**(1): p. 26-35.
87. Lynch, T.L. and S. Sadayappan, Surviving the infarct: A profile of cardiac myosin binding protein-C pathogenicity, diagnostic utility, and proteomics in the ischemic myocardium. *Proteomics. Clinical applications*, 2014. **8**(7-8): p. 569–577.
88. Lynch, T.L.t., et al., Cardiac inflammation in genetic dilated cardiomyopathy caused by MYBPC3 mutation. *J Mol Cell Cardiol*, 2017. **102**: p. 83-93.

89. Mabileau, G. and A. Sabokbar, Interleukin-32 promotes osteoclast differentiation but not osteoclast activation. *PLoS One*, 2009. **4**(1): p. e4173.
90. Maekawa, N., et al., Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-alpha. *J Am Coll Cardiol*, 2002. **39**(7): p. 1229-35.
91. Mamat, U., et al., Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins. *Microb Cell Fact*, 2015. **14**: p. 57.
92. Marjot, J., et al., The development and application of a high-sensitivity immunoassay for cardiac myosin-binding protein C. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, 2016. **170**: p. 17-25.e5.
93. Matsumura, T., et al., TGF-beta down-regulates IL-1alpha-induced TLR2 expression in murine hepatocytes. *J Leukoc Biol*, 2004. **75**(6): p. 1056-61.
94. McConnell, B.K., et al., Comparison of two murine models of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res*, 2001. **88**(4): p. 383-9.
95. McConnell, B.K., et al., Dilated cardiomyopathy in homozygous myosin-binding protein-C mutant mice. *J Clin Invest*, 1999. **104**(12): p. 1771.
96. McGaha, T.L., et al., Molecular mechanisms of interleukin-4-induced up-regulation of type I collagen gene expression in murine fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 2003. **48**(8): p. 2275-84.
97. Meng, Q., et al., Myofibroblast-Specific TGFbeta Receptor II Signaling in the Fibrotic Response to Cardiac Myosin Binding Protein C-Induced Cardiomyopathy. *Circ Res*, 2018. **123**(12): p. 1285-1297.
98. Meng, Q., et al., MMI-0100 Inhibits Cardiac Fibrosis in a Mouse Model Overexpressing Cardiac Myosin Binding Protein C. *Journal of the American Heart Association*, 2017. **6**(9).
99. Meschiari, C.A., et al., Macrophage overexpression of matrix metalloproteinase-9 in aged mice improves diastolic physiology and cardiac wound healing after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018. **314**(2): p. H224-H235.
100. Mia, M.M., M. Boersema, and R.A. Bank, Interleukin-1beta attenuates myofibroblast formation and extracellular matrix production in dermal and lung fibroblasts exposed to transforming growth factor-beta1. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e91559.



101. Mouton, A.J., et al., Fibroblast polarization over the myocardial infarction time continuum shifts roles from inflammation to angiogenesis. *Basic Res Cardiol*, 2019. **114**(2): p. 6.
102. Newby, L.K., et al., Time from symptom onset to treatment and outcomes after thrombolytic therapy. GUSTO-1 Investigators. *J Am Coll Cardiol*, 1996. **27**(7): p. 1646-55.
103. Nian, M., et al., Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res*, 2004. **94**(12): p. 1543-53.
104. Nold-Petry, C.A., et al., IL-32-dependent effects of IL-1beta on endothelial cell functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(10): p. 3883-8.
105. O'Rourke, S.A., A. Dunne, and M.G. Monaghan, The Role of Macrophages in the Infarcted Myocardium: Orchestrators of ECM Remodeling. *Front Cardiovasc Med*, 2019. **6**: p. 101.
106. Ohm, I.K., et al., Toll-like receptor 9 mediated responses in cardiac fibroblasts. *PLoS One*, 2014. **9**(8): p. e104398.
107. Ono, K., et al., Prevention of myocardial reperfusion injury in rats by an antibody against monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1. *Lab Invest*, 1999. **79**(2): p. 195-203.
108. Park, H.J., et al., A novel TLR4 binding protein, 40S ribosomal protein S3, has potential utility as an adjuvant in a dendritic cell-based vaccine. *J Immunother Cancer*, 2019. **7**(1): p. 60.
109. Peet, C., et al., Cardiac monocytes and macrophages after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 2019.
110. Pfeffer, M.A. and E. Braunwald, Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*, 1990. **81**(4): p. 1161-72.
111. Planesse, C., et al., Recombinant human HSP60 produced in ClearColi BL21(DE3) does not activate the NFkappaB pathway. *Cytokine*, 2015. **73**(1): p. 190-5.
112. Pomatto, M.A.C., et al., Improved Loading of Plasma-Derived Extracellular Vesicles to Encapsulate Antitumor miRNAs. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019. **13**: p. 133-144.
113. Ponikowski, P., et al., 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of

- acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*, 2016. **37**(27): p. 2129-2200.
114. Powell, T., D.A. Terrar, and V.W. Twist, Electrical properties of individual cells isolated from adult rat ventricular myocardium. *J Physiol*, 1980. **302**: p. 131-53.
  115. Prabhu, S.D. and N.G. Frangogiannis, The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res*, 2016. **119**(1): p. 91-112.
  116. Prat-Vidal, C., et al., Identification of temporal and region-specific myocardial gene expression patterns in response to infarction in swine. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e54785.
  117. Previs, M.J., et al., Molecular mechanics of cardiac myosin-binding protein C in native thick filaments. *Science (New York, N.Y.)*, 2012. **337**(6099): p. 1215–1218.
  118. Razzaque, M.A., et al., An endogenously produced fragment of cardiac myosin-binding protein C is pathogenic and can lead to heart failure. *Circ Res*, 2013. **113**(5): p. 553-61.
  119. Ridker, P.M., Targeting inflammatory pathways for the treatment of cardiovascular disease. *Eur Heart J*, 2014. **35**(9): p. 540-3.
  120. Ridker, P.M., From C-Reactive Protein to Interleukin-6 to Interleukin-1: Moving Upstream To Identify Novel Targets for Atheroprotection. *Circ Res*, 2016. **118**(1): p. 145-56.
  121. Ridker, P.M., et al., Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med*, 2017. **377**(12): p. 1119-1131.
  122. Ridker, P.M., et al., Relationship of C-reactive protein reduction to cardiovascular event reduction following treatment with canakinumab: a secondary analysis from the CANTOS randomised controlled trial. *Lancet*, 2018. **391**(10118): p. 319-328.
  123. Rissanen, T.T., et al., VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ Res*, 2003. **92**(10): p. 1098-106.
  124. Ritchie, M.E., et al., limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 2015. **43**(7): p. e47-e47.

125. Roffi, M., et al., 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*, 2016. **37**(3): p. 267-315.
126. Roh, J.S. and D.H. Sohn, Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw*, 2018. **18**(4): p. e27.
127. Sanchis-Gomar, F., et al., Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome. *Ann Transl Med*, 2016. **4**(13): p. 256.
128. Schafer, S., et al., IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis. *Nature*, 2017. **552**(7683): p. 110-115.
129. Schulte, C., et al., Comparative Analysis of Circulating Noncoding RNAs Versus Protein Biomarkers in the Detection of Myocardial Injury. *Circ Res*, 2019. **125**(3): p. 328-340.
130. Schwarz, H., et al., Residual endotoxin contaminations in recombinant proteins are sufficient to activate human CD1c<sup>+</sup> dendritic cells. *PLoS One*, 2014. **9**(12): p. e113840.
131. Shao, C., et al., Coronary Artery Disease: From Mechanism to Clinical Practice. *Adv Exp Med Biol*, 2020. **1177**: p. 1-36.
132. Shinde, A.V. and N.G. Frangogiannis, Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *J Mol Cell Cardiol*, 2014. **70**: p. 74-82.
133. Sigwart, U., Non-surgical myocardial reduction for hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Lancet*, 1995. **346**(8969): p. 211-4.
134. Smith, R.S., et al., Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am J Pathol*, 1997. **151**(2): p. 317-22.
135. Stone, G.W., et al., Five-Year Outcomes after PCI or CABG for Left Main Coronary Disease. *N Engl J Med*, 2019. **381**(19): p. 1820-1830.
136. Strimbu, K. and J.A. Tavel, What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*, 2010. **5**(6): p. 463-6.
137. Sun, K.H., et al., alpha-Smooth muscle actin is an inconsistent marker of fibroblasts responsible for force-dependent TGFbeta activation or collagen production across multiple models of organ fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016. **310**(9): p. L824-36.

138. Sun, M., et al., Excessive tumor necrosis factor activation after infarction contributes to susceptibility of myocardial rupture and left ventricular dysfunction. *Circulation*, 2004. **110**(20): p. 3221-8.
139. Talman, V. and H. Ruskoaho, Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration. *Cell Tissue Res*, 2016. **365**(3): p. 563-81.
140. Tang, D., et al., PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev*, 2012. **249**(1): p. 158-75.
141. Tarbit, E., et al., Biomarkers for the identification of cardiac fibroblast and myofibroblast cells. *Heart Fail Rev*, 2019. **24**(1): p. 1-15.
142. Tarzami, S.T., et al., Chemokine expression in myocardial ischemia: MIP-2 dependent MCP-1 expression protects cardiomyocytes from cell death. *J Mol Cell Cardiol*, 2002. **34**(2): p. 209-21.
143. Thuijs, D., et al., Percutaneous coronary intervention versus coronary artery bypass grafting in patients with three-vessel or left main coronary artery disease: 10-year follow-up of the multicentre randomised controlled SYNTAX trial. *Lancet*, 2019. **394**(10206): p. 1325-1334.
144. Tian, M., et al., Tumor necrosis factor-alpha and its role as a mediator in myocardial infarction: A brief review. *Chronic Dis Transl Med*, 2015. **1**(1): p. 18-26.
145. Troidl, C., et al., Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2009. **13**(9b): p. 3485-3496.
146. Turner, N.A., Inflammatory and fibrotic responses of cardiac fibroblasts to myocardial damage associated molecular patterns (DAMPs). *J Mol Cell Cardiol*, 2016. **94**: p. 189-200.
147. Van Lint, P. and C. Libert, Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *J Leukoc Biol*, 2007. **82**(6): p. 1375-81.
148. Vilahur, G. and L. Badimon, Ischemia/reperfusion activates myocardial innate immune response: the key role of the toll-like receptor. *Front Physiol*, 2014. **5**: p. 496.
149. Viswanathan, S.K., et al., Hypertrophic cardiomyopathy clinical phenotype is independent of gene mutation and mutation dosage. *PLoS One*, 2017. **12**(11): p. e0187948.

150. Wang, X., et al., Identification of TLR2 and TLR4-induced microRNAs in human mesenchymal stem cells and their possible roles in regulating TLR signals. *Mol Med Rep*, 2016. **13**(6): p. 4969-80.
151. Wang, X.Y., et al., The Biomarkers for Acute Myocardial Infarction and Heart Failure. *Biomed Res Int*, 2020. **2020**: p. 2018035.
152. Wei, L.H., et al., Deficiency of Smad7 enhances cardiac remodeling induced by angiotensin II infusion in a mouse model of hypertension. *PLoS One*, 2013. **8**(7): p. e70195.
153. Winegrad, S., Cardiac Myosin Binding Protein C. *Circulation research*, 1999. **84**(10): p. 1117–1126.
154. Witayavanitkul, N., et al., Myocardial Infarction-induced N-terminal Fragment of Cardiac Myosin-binding Protein C (cMyBP-C) Impairs Myofilament Function in Human Myocardium\*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014. **289**(13): p. 8818–8827.
155. Xuan, W., et al., Elevated circulating IL-32 presents a poor prognostic outcome in patients with heart failure after myocardial infarction. *Int J Cardiol*, 2017. **243**: p. 367-373.
156. Yan, X., Z. Liu, and Y. Chen, Regulation of TGF-beta signaling by Smad7. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2009. **41**(4): p. 263-72.
157. Yogeswaran, A., et al., The C0-C1f Region of Cardiac Myosin Binding Protein-C Induces Pro-Inflammatory Responses in Fibroblasts via TLR4 Signaling. *Cells*, 2021. **10**(6).
158. Yu, L. and Z. Feng, The Role of Toll-Like Receptor Signaling in the Progression of Heart Failure. *Mediators Inflamm*, 2018. **2018**: p. 9874109.
159. Zhai, Y., et al., Toll-like receptor 4 mediates the inflammatory responses and matrix protein remodeling in remote non-ischemic myocardium in a mouse model of myocardial ischemia and reperfusion. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0121853.
160. Zhou, L., et al., Monocyte chemoattractant protein-1 induces a novel transcription factor that causes cardiac myocyte apoptosis and ventricular dysfunction. *Circ Res*, 2006. **98**(9): p. 1177-85.
161. Zijlstra, F., et al., Clinical characteristics and outcome of patients with early (<2 h), intermediate (2-4 h) and late (>4 h) presentation treated by primary coronary angioplasty or thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *Eur Heart J*, 2002. **23**(7): p. 550-7.

## 9. Publikationsverzeichnis

### Originalartikel

- Teilergebnisse und Abbildungen der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht: Yogeswaran\*, Troidl\* et al: The C0-C1f region of cardiac myosin binding protein-C induces pro-inflammatory responses in fibroblasts via TLR4 signaling, 2021, Cells (IF: 6,6), \* contributed equally

### Kongressbeiträge

- Kongress der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) 2018, Yogeswaran et al: Development of a qualitative and quantitative detection method for the N-terminal fragment of cardiac myosin binding protein c (MYBPC3), 2018, Eur Heart J (IF: 30,0)
- Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) 2019, Yogeswaran et al: C0-C1f: First measurements of a promising cardiac biomarker, 2019, Clin Res Cardiol (IF: 5,5)
- Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) 2020, Yogeswaran et al: Evaluation of effects of the N-terminal fragment of cardiac myosin binding protein-C on cardiac fibroblasts, 2020, Clin Res Cardiol (IF: 5,5)
- Kongress der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) 2021, Lipps, Yogeswaran et al: C0-C1f region of cardiac myosin binding protein-C induces pro-inflammatory responses in fibroblasts, 2021, Eur Heart J (IF: 30,0)

### Weitere, von der Dissertation unabhängig publizierte Originalartikel

- Yogeswaran et al: Evaluation of pulmonary hypertension by right heart catheterisation: does timing matter? 2020, European Respiratory Journal (IF: 16,7)
- Richter, Yogeswaran und Tello: Pulmonary complications of tyrosine kinase inhibitors in myeloproliferative disorders, 2020, European Respiratory Journal (IF: 16,7)
- Yogeswaran et al: Risk assessment in severe pulmonary hypertension due to interstitial lung disease, 2020, Journal of Heart and Lung Transplantation (IF: 10,2)

- Yogeswaran et al: EXPRESS: Impact of SARS-CoV-2 pandemic on pulmonary hypertension out-patient clinics in Germany: A multi-centre study, 2020, Pulmonary Circulation (IF: 3,0)
- Yogeswaran et al: Advanced risk stratification of intermediate risk group in pulmonary arterial hypertension, 2020, Pulmonary Circulation (IF: 3,0)
- Gall\*, Yogeswaran\* et al: Validity of echocardiographic tricuspid regurgitation gradient to detect new definition of pulmonary hypertension, \* contributed equally, 2021, EClinicalMedicine (IF: N/A)
- Yogeswaran et al: Risk assessment in pulmonary hypertension based on routinely measured laboratory parameters, 2021, Journal of Heart and Lung Transplantation (IF: 10,2)
- Richter, Tello, Yogeswaran et al: Sex Differences in Right Ventricular-Pulmonary Arterial Coupling in Pulmonary Arterial Hypertension, 2021, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine (IF: 21,4)
- Richter, Hsu, Yogeswaran et al: Right ventricular pressure-volume loop shape and systolic pressure change in pulmonary hypertension, 2021, American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology (IF: 5,5)
- Richter\*, Yogeswaran\* et al: A novel non-invasive and echocardiography-derived method for quantification of right ventricular pressure-volume loops, \* contributed equally, 2021, European Heart Journal – Cardiovascular Imaging (IF: 6,9)
- Tello, Yogeswaran, Ghofrani, Gall: Reply to "Risk stratification in PH associated with interstitial lung disease: The Holy Grail?", 2021, Journal of Heart and Lung Transplantation (IF: 10,2)
- Richter, Zedler, Berliner, Douschan, Gall, Ghofrani, Kimmig, Kremer, Olsson, Brito Da Rocha, Rosenkranz, Seeger, Yogeswaran et al: Clinical Relevance of Right Atrial Functional Response to Treatment in Pulmonary Arterial Hypertension, 2021, Frontiers in Cardiovascular Medicine (IF: 6,1)
- Yogeswaran et al: Relevance of Cor Pulmonale in COPD With and Without Pulmonary Hypertension: a Retrospective Cohort Study, 2022, Frontiers in Cardiovascular Medicine (IF: 6,1)

**Weitere, von der Dissertation unabhängige Kongressbeiträge**

- Deutsches Zentrum für Lungenforschung (DZL) Jahrestreffen 2019, Yogeswaran et al: Risk Stratification Using Right Heart Catheterization in Pulmonary Hypertension – The Influence of Rest After Placing The RHC, DZL Abstract Book, 2019
- Deutsches Zentrum für Lungenforschung (DZL) Jahrestreffen 2019, Faber, Yogeswaran et al: Risk Stratification in Patients with PH due to Chronic Lung Disease and/or Hypoxia, DZL Abstract Book, 2019
- PH-DACH Symposium 2019, Yogeswaran et al: Update der PH Definition: Ist Screening mittels Echokardiographie weiterhin zuverlässig? 2019
- Kongress der European Respiratory Society (ERS) 2020, Yogeswaran et al: Risk assessment in severe pulmonary hypertension due to interstitial lung disease, Eur Respir J (IF: 16,7), 2020
- Kongress der European Respiratory Society (ERS) 2020, Yogeswaran et al: In-depth risk stratification in pulmonary arterial hypertension, Eur Respir J (IF: 16,7), 2020
- Kongress der European Respiratory Society (ERS) 2020, Yogeswaran et al: Impact of timing on right heart catheterization measurements in pulmonary hypertension, Eur Respir J (IF: 16,7), 2020
- Kongress der European Respiratory Society (ERS) 2020, Gall, Yogeswaran et al: Reliability of echo systolic pulmonary arterial pressure to detect new definition of pulmonary hypertension, Eur Respir J (IF: 16,7), 2020
- Kongress der European Respiratory Society (ERS) 2020, Lund, Yogeswaran et al: Gamma-Glutamyltransferase in pulmonary hypertension: A reliable biomarker? Eur Respir J (IF: 16,7), 2020
- Kongress des Pulmonary Vascular Research Institute (PVRI) 2020, Richter, Badagliacca, Wan, Yogeswaran et al: Right ventricular dyssynchrony: association with load-independent right ventricular function in severe pulmonary arterial hypertension, Pulm Circ (IF: 3,0), 2021
- Kongress des Pulmonary Vascular Research Institute (PVRI) 2021, Yogeswaran et al: Risk stratification in pulmonary hypertension due to chronic obstructive pulmonary disease, Pulm Circ (IF: 3,0), 2021



## 10. Ehrenwörtliche Erklärung

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

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

35392 Gießen, den

Ort, Datum

Unterschrift

## **11. Danksagung**

Ich danke Privatdozent Dr. Christian Troidl für die Überlassung dieses interessanten Forschungsthemas und somit für die Ermöglichung einer erfolgreichen, experimentellen Dissertation.

Zudem möchte ich besonders Dr. Christoph Lipps dafür danken, dass er mich in dieses Thema sowie die Laborarbeit eingeführt hat und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand! Ohne ihn hätte ich meine Promotion nicht auf diesem Niveau beenden können.

Danken möchte ich auch allen weiteren Beteiligten: Behnoush, Antje, Steffanie, Sabine, Henrike und Daniela, die mir durch ihre jahrelange Erfahrung als MTAs halfen, Experimente erfolgreich durchzuführen. Mein weiterer Dank gilt Dr. Jochen Wilhelm für die hilfreichen Tipps bei statistischen Fragen sowie der Microarray Analysen.

Meinen Freunden und meiner Familie danke ich für die Zuversicht und Unterstützung während meines ganzen Studiums und der Promotion.