

Myokardiales *Remodeling* bei der Entwicklung pathologischer Hypertrophie:

Die Rolle der Hyaluronsäure

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Katarzyna Hackert
aus Chojnice

Düsseldorf, 19. Oktober 2018

aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. *Dr. med.* Joachim P. Schmitt
2. Prof. *Dr. rer. nat. Dr. h. c.* Holger Stark

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2018

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
1. Einleitung	1
1.1 Hypertrophie des Herzens	1
1.1.1 Pathogenese.....	1
1.1.2 Symptomatik, Diagnostik und Therapie	4
1.1.3 Experimentelle Hypertrophie-Modelle.....	5
1.1.3.1 H9C2-Kardiomyoblasten nach Isoprenalin-Stimulation	5
1.1.3.2 Mausmodell mit <i>Knockin</i> -Mutationen im kardialen Myosin	6
1.1.3.3 Linksventrikuläre Druckbelastung durch operative Aortenstenose im Mausmodell.....	8
1.2 Rolle der Extrazellulärmatrix während der Myokardhypertrophie	10
1.2.1 Bedeutung der Hyaluronsäure für die Extrazellulärmatrix.....	12
1.2.2 Zelluläre Regulation der Hyaluronsäure	14
1.2.3 Pharmakologische Inhibition der Hyaluronsäure-Synthese durch 4-Methylumbelliferon	15
1.3 Zielsetzung	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Feinchemikalien, Medien, Lösungen und <i>Kits</i>	19
2.1.2 Antikörper	21
2.1.3 Biologisches Material	22
2.1.3.1 Zelllinie	22
2.1.3.2 Mäuse	22
2.2 Methoden	23
2.2.1 Zellversuche.....	23
2.2.1.1 Kultivierung von H9C2-Kardiomyoblasten	23
2.2.1.2 Isoprenalin-Stimulation und 4-MU-Behandlung.....	23
2.2.2 Tierversuche	24
2.2.2.1 Verwendete Tiere sowie Behandlung, Organentnahme und Probenaufbereitung	24
2.2.2.2 Operative Stenosierung des Aortenbogens und Schein-Operation	27
2.2.2.3 Echokardiografie	28

Inhaltsverzeichnis

2.2.3	Histologie und Zytologie	29
2.2.3.1	Zytochemische Färbungen	29
2.2.3.1.1	Phalloidin	29
2.2.3.2	Histochemische Färbungen	30
2.2.3.2.1	Paraffinschnitte von Myokardbiopsien	30
2.2.3.2.2	Hyaluronsäure	30
2.2.3.2.3	Makrophageninfiltration.....	31
2.2.3.2.4	Fibrose.....	32
2.2.3.2.5	Querschnittsfläche von Kardiomyozyten	33
2.2.4	Genexpressionsanalyse	34
2.2.4.1	RNA-Isolation und RNA-Konzentrationsbestimmung	34
2.2.4.2	Reverse Transkription und quantitative <i>realtime Polymerase Chain Reaction</i>	34
2.2.4.3	<i>Gene Array</i> Analyse	35
2.2.5	Proteinbiochemie	36
2.2.5.1	Massenspektrometrie	36
2.2.5.2	Hyaluronsäure-Bindeprotein Sandwich ELISA-ähnlicher <i>Assay</i>	37
2.2.5.3	Proteinnachweis von ERK1/2 und pERK1/2 mittels <i>Western Blot</i>	37
2.2.5.4	Durchflusszytometrie	38
2.2.6	Statistische Auswertungen	39
3.	Ergebnisse.....	40
3.1	Transkriptom- und Proteom-Analysen im genetischen Hypertrophie-Mausmodell...40	
3.1.1	Analyse des Transkriptoms im Herzen	41
3.1.2	Analyse des Proteoms im Herzen	46
3.1.3	Gegenüberstellung von Transkriptom- und Proteomanalyse	51
3.1.4	Wechsel des untersuchten Hypertrophie-Mausmodells	52
3.1.5	Validierung der identifizierten Kandidatengene im Hypertrophie-Mausmodell nach operativer Aortenstenose.....	53
3.1.5.1	Untersuchung der zeitabhängigen Genexpression der <i>Has</i> -Isoformen 1 bis 3 im Herzen	54
3.2	Rolle der Hyaluronsäure im Hypertrophie-Zellmodell	56
3.2.1	Effekt von 4-Methylumbelliferon auf das Größenwachstum von H9C2-Zellen nach Isoprenalin-Stimulation	56
3.2.2	Effekt von 4-Methylumbelliferon auf die Hyaluronsäure-Synthese in H9C2-Zellen.....	57
3.3	Rolle der Hyaluronsäure im Hypertrophie-Mausmodell nach operativer Aortenstenose und 4-Methylumbelliferon-Behandlung	59
3.3.1	Operative Aortenstenose als <i>in vivo</i> -Hypertrophie-Mausmodell.....	60
3.3.2	Dokumentation des Körper- und Herzgewichts sowie der Tibialänge	60

Inhaltsverzeichnis

3.3.3	Schätzung der Überlebensraten nach Kaplan-Meier	64
3.3.4	Untersuchung der Hyaluronsäure-Synthese im Herzen und im Blutplasma.....	65
3.3.5	Analyse der Herzfunktion	68
3.3.6	Untersuchung von Hypertrophie-Markern.....	72
3.3.7	Quantifizierung der interstitiellen und perivaskulären Fibrose.....	75
3.3.8	Untersuchung der Entzündungsreaktionen nach operativer Aortenstenose	77
3.3.8.1	Genexpressionsanalysen von Entzündungsmarkern im Herzen	77
3.3.8.2	Makrophagen-Infiltration im Herzen mittels Mac-2-Färbung.....	79
3.3.8.3	Veränderungen der Immunzellkomposition im Herzen.....	80
3.3.8.4	Veränderungen der Immunzellkomposition im Blut.....	84
4.	Diskussion	89
4.1	Die Bedeutung der Extrazellulärmatrix und Hyaluronsäure in der Pathogenese der hypertrophischen Kardiomyopathie.....	90
4.1.1	Erkenntnisse aus den Transkriptom- und Proteom-Analysen	90
4.1.2	Die Hyaluronsäure als potentielles Schlüsselmolekül?	91
4.2	Pharmakologische Modulation der Hyaluronsäure-Synthese durch 4-Methylumbelliferon im Hypertrophie-Modell	94
4.2.1	Applikation von 4-Methylumbelliferon in einem <i>in vitro</i> -Hypertrophie-Modell	94
4.2.2	Pharmakokinetische Parameter von 4-Methylumbelliferon in Mausmodellen	95
4.2.3	Detektion der Hyaluronsäure nach 4-Methylumbelliferon-Behandlung	96
4.2.4	4-Methylumbelliferon-vermittelte Effekte auf das kardiale <i>Remodeling</i> nach chronischer Druckbelastung sowie auf die Herzfunktion.....	98
4.3	Rolle von Immunzellen während des myokardialen <i>Remodeling</i>	100
4.3.1	Bedeutung der zirkulierenden Monozyten	100
4.3.2	Bedeutung der Makrophagen im Herzen.....	102
4.4	Potentiell Modell.....	104
4.5	Schwierigkeiten im Verlauf der Arbeit und mögliche Limitationen	108
4.5.1	Wechsel des Hypertrophie-Modells	108
4.5.2	Pleiotrope Effekte von 4-Methylumbelliferon	109
4.5.3	Gewichtsverlust unter 4-Methylumbelliferon	109
5.	Zusammenfassung.....	111
6.	Summary.....	112
	Literaturverzeichnis	113
	Appendix.....	123
	Veröffentlichungen.....	128
	Lebenslauf	129
	Danksagung.....	130
	Eidesstattliche Erklärung	131

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der pathophysiologischen Prozesse bei hypertrophischem <i>Remodeling</i> . Dargestellt sind die morphologischen, molekularen und biochemischen Veränderungen während der adaptiven und maladaptiven Phase. Abbildung modifiziert nach [8].	2
Abbildung 2: Dreidimensionale Darstellung der Kopfdomäne der schweren Myosinkette (<i>Protein Data Bank ID 2MYS</i>). Durch Pfeile gekennzeichnet sind die Lokalisationen der Aminosäuresubstitutionen, Valin 606 Methionin (V606M) und Arginin 453 Cystein (R453C), verursacht durch die HCM-assoziierten Punktmutationen. Die Proteinstruktur wurde unter Verwendung der Software UCSF Chimera 1.13 graphisch abgebildet [39].	7
Abbildung 3: Schematische Darstellung der operativen Aortenstenose (TAC). Linker Ventrikel als LV und rechter Ventrikel als RV abgekürzt.	9
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Umbauprozesse in der Extrazellulärmatrix (EZM) während chronischer Druckbelastung im Herzen. Dargestellt ist die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) vermittelt durch mechanischen Stress nach Druckbelastung. Die Stimulation kardialer Fibroblasten erfolgt durch Zytokine, RAAS und den Transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF- β) und resultiert in Umbauprozesse der EZM. Matrix-Metalloproteasen (MMPs) sind an der Akkumulation von pro-inflammatorischen Matrikinen beteiligt. Abbildung modifiziert nach [50].	11
Abbildung 5: Strukturformel der Hyaluronsäure. Die Hyaluronäure ist ein lineares Molekül bestehend aus alternierenden Disacchariden von D-Glukuronsäure und N-Acetyl-D-Glukosamin.	12
Abbildung 6: Schematische Darstellung der membranständigen Hyaluronsäure-Rezeptoren. Dargestellt sind intrazelluläre Signalkaskaden und die damit verbundenen Effekte auf Zell- und Gewebefunktion. Abbildung modifiziert nach [62].	13
Abbildung 7: Strukturformel von 4-Methylumbelliferon (4-MU). 4-MU ist ein 7-Hydroxycumarin-(Umbelliferon)-Derivat.	15
Abbildung 8: 4-Methylumbelliferon (4-MU) inhibiert die Hyaluronsäure-Synthese. 4-MU als kompetitives Substrat wird anstelle eines Uridindiphosphat (UDP) durch die UDP-Glukuronosyltransferase (UGT) mit D-Glukuronsäure (GlcA) verknüpft. Durch Substratverarmung wird die Hyaluronsäure-Synthase (HAS) gehemmt. Das Substrat N-Acetyl-D-Glukosamin (GlcNAc) ist nicht von der 4-MU-vermittelten Hemmung betroffen. Abbildung modifiziert nach [90].	16
Abbildung 9: Studiendesign nach 4-Methylumbelliferon (4-MU)-Behandlung. Männliche C57BL/6J Mäuse wurden ab einem Alter von 16 Wochen mit 4-MU (50g/kg) oder einer Kontrolldiät behandelt. Nach einer 10-tägigen Behandlungsdauer wurden alle Tiere einer operativen Stenosierung des Aortenbogens (TAC)- oder einer Schein (<i>Sham</i>)-Operation unterzogen. Es wurden zwei Nachuntersuchungszeiträume betrachtet, 3 Tage sowie 7 Wochen nach TAC- bzw. <i>Sham</i> -OP. Für die Langzeit-Studie wurden zudem 1 Tag vor, sowie 2 und 7 Wochen nach TAC-OP echokardiografische Untersuchungen (Echo) durchgeführt.	25
Abbildung 10: Studiendesign nach 4-Methylumbelliferon (4-MU)-Behandlung für durchflusszytometrische Analyse. Männliche C57BL/6J Mäuse wurden ab einem Alter von 16 Wochen mit 4-MU (50g/kg) oder einer Kontrolldiät behandelt. Nach einer 10-tägigen Behandlungsdauer wurden alle Tiere einer operativen Stenosierung des Aortenbogens (TAC) unterzogen. Kurz vor TAC- sowie 3 Tage nach TAC-Operation wurde Blut (Tag 0) bzw. Blut und Herz (Tag 3) für eine durchflusszytometrische Analyse der enthaltenen Immunzellen entnommen.	26
Abbildung 11: Isolierte Proteine aus einem Mauserz. Das Proteinlysate wurde mittels SDS-PAGE in einem Polyacrylamidgel über eine lange und kurze Laufstrecke aufgetrennt und mittels Silber-Färbung visualisiert (n = 1).	36

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 12: Korrelation der Genexpression gemessen durch qPCR und <i>Gene Array</i> . Die Mittelwerte der relativen x-fachen Änderung (<i>fold change</i>) der Expressionsstärke sind im Vergleich zu Wildtyp-Mausherzen von 15 regulierten Genen als Streudiagramm dargestellt. Die Messdaten des Rezeptors CD44 sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. Eine entsprechende Regressionslinie ($y = 1,983x + 0,7713$) ist abgebildet.	45
Abbildung 13: <i>Heatmap</i> und hierarchische Klassifizierung. Abgebildet sind die farbcodierten Intensitäten von 957 identifizierten Proteinen aus der massenspektrometrische Analyse von sechs VM/RC- gegen sechs alters-, Mausstamm- und geschlechts-adaptierte Wildtyp (WT)-Mausherzen. Der gelbe Farbbereich zeigt eine relativ höhere Abundanz und der rote Farbbereich zeigt eine relativ niedrigere Abundanz der identifizierten Proteine an. Die hierarchische Klassifizierung ordnet den Proben anhand der Intensitätsprofile eine übergeordnete Gruppe zu.	46
Abbildung 14: <i>Volcano Plot</i> des Vergleichs von VM/RC- und Wildtyp-Mausherzen. Die Kästchen repräsentieren die 957 identifizierten Proteine, davon wurden 28 Proteine (schwarz-markierte Kästchen) mit dem GO <i>term extracellular matrix</i> (EZM) annotiert. Die zugehörigen EZM-Proteine sind als Gensymbole abgekürzt.	48
Abbildung 15: <i>Volcano Plot</i> des Vergleichs von VM/RC- und Wildtyp-Mausherzen. Die Kästchen repräsentieren die 957 identifizierten Proteine, davon wurden 62 Proteine (schwarz-markierte Kästchen) mit dem GO <i>term biological adhesion</i> (EZM) annotiert. Die zugehörigen Proteine sind als Gensymbole abgekürzt.	50
Abbildung 16: Venn Diagramm der regulierten Transkripte und Proteine aus Transkriptom- bzw. Proteom-Analyse. Die graphische Darstellung erfolgte unter Verwendung des <i>Online-Tools Venny 2.1</i> [106].	52
Abbildung 17: Kaplan-Meier Überlebenskurve der (VM/+)-, (RC/+)-, VM/RC- und Wildtyp (WT)-Mäuse aus der Würzburger Zucht. Gepunktete Linien markieren Überlebenswahrscheinlichkeit von Jungtieren im Alter von 14 Tagen aus der Düsseldorfer Zucht (VM/VM x RC/+). n = 7-11; <i>Log-Rank-Test</i> ; **** p < 0,0001.	53
Abbildung 18: Relative <i>Has1-3</i> mRNA-Expression im gesunden Herzen von C57BL/6J Mäusen. Mittels quantitativer PCR wurde die Expressionsstärke der <i>Has</i> -Isoformen 1 bis 3 bestimmt. Als Referenzgen wurde <i>Gapdh</i> verwendet. Dargestellt als gerundete Mittelwerte. n = 4.	54
Abbildung 19: Kardiale mRNA-Expression von <i>Has1</i> , <i>Has2</i> und <i>Has3</i> 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC) bzw. nach Schein-Operation (3dpSham). Als Referenzgen wurde <i>Gapdh</i> verwendet. Dargestellt als Vielfaches der Kontrolle (hier: 3dpSham); Mittelwert ± SEM; n = 5 - 11; <i>t-Test</i> ; ** p < 0,001.	55
Abbildung 20: Zellgröße von H9C2-Zellen nach Hypertrophie-Stimulation und 4-Methyl-umbelliferon (4-MU)-Behandlung. Repräsentative Aufnahmen der Phalloidin-Färbung von H9C2-Zellen (Maßstabsbalken entspricht 100 µm). Quantifizierung der Zellgröße von H9C2-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit bzw. ohne Isoprenalin (Iso, 100µM) und 4-MU (100µM). Dargestellt als Vielfaches der Kontrolle (hier: unbehandelt); Mittelwert ± SEM; n = 6; <i>RM one-way ANOVA</i> ; ***p < 0,001 gegen Kontrolle.	57
Abbildung 21: Hyaluronsäure (HA)-Sekretion in H9C2 Zellen. Konzentrationsbestimmung sekretierter HA im Zellüberstand von H9C2 Zellen nach 24-stündiger Hypertrophie Stimulation durch Isoprenalin (Iso, 100µM) und 4-Methylumbelliferon (4-MU, 100µM) Behandlung mittels HA-Bindeprotein <i>Sandwich</i> ELISA-ähnlichem Assay. Dargestellt als Vielfaches der Kontrolle (hier: H9C2 unbehandelt); Mittelwert ± SEM; n = 3; <i>RM one-way ANOVA</i> ; *p < 0,05 gegen Kontrolle.	58
Abbildung 22: Maximaler Druckgradient im Aortenbogen 7 Wochen nach operativer Aortenstenose (7wpTAC). Der maximale Druckgradient (PG _{max} in mmHg) wurde in 4-Methyl-umbelliferon-behandelten Mäusen (4-MU) und unbehandelten Kontrollmäusen (K) mittels Doppler-Ultraschalluntersuchung bestimmt. Dargestellt als Mittelwert ± SEM; n = 13 - 15; <i>t-Test</i> ; n. s. (nicht signifikant) p > 0,05.	60

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 23: Körpergewicht während Behandlungsverlauf für den Akutzeitraum, 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC) bzw. nach Schein-Operation (3dpSham). Das Körpergewicht beider Gruppen wurde ab Fütterungsbeginn (Tag 0) bis zur Organentnahme (OE am Tag 11) in 4-Methylumbelliferon-behandelten Mäusen (4-MU) und unbehandelten Kontrollmäusen (K) täglich dokumentiert. Die blaue bzw. rote Linie markiert die Schein- bzw. TAC-Operation am 8.Versuchstag. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; n = 5 – 11; <i>two-way</i> ANOVA.....	61
Abbildung 24: Finales Körpergewicht und Tibiallänge für den Akutzeitraum, 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC) bzw. nach Schein-Operation (3dpSham). Verglichen wurden 4-Methylumbelliferon-behandelte Mäuse (4-MU) und unbehandelte Kontrollmäuse (K) der beiden Gruppen, 3dpSham und 3dpTAC, bei Versuchsende. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; n = 5 – 11; <i>one-way</i> ANOVA.....	62
Abbildung 25: Körpergewicht während Behandlungsverlauf für den langen Nachbeobachtungszeitraum, 7 Wochen nach operativer Aortenstenose (7wpTAC). Das Körpergewicht wurde ab Fütterungsbeginn (Tag 0) bis zur Organentnahme (OE am Tag 59) in 4-Methylumbelliferon-behandelten Mäusen (4-MU) und unbehandelten Kontrollmäusen (K) fast täglich dokumentiert. Die rote Linie markiert die TAC-Operation am 8.Versuchstag. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; n = 13-15; <i>two-way</i> ANOVA.....	62
Abbildung 26: Finales Körpergewicht und Tibiallänge für den langen Nachbeobachtungszeitraum, 7 Wochen nach operativer Aortenstenose (7wpTAC). Verglichen wurden 4-Methylumbelliferon-behandelte Mäuse (4-MU) und unbehandelte Kontrollmäuse (K) bei Versuchsende. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; n = 13; <i>t</i> -Test.	63
Abbildung 27: Kaplan-Meier Überlebenskurve von 4-Methylumbelliferon-behandelten Mäusen (4-MU) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollmäusen (K) nach operativer Aortenstenose (TAC-OP). Die rote Linie markiert die TAC-OP am 8.Versuchstag. n = 32 – 40; <i>Log-Rank</i> -Test; **p < 0,001.	64
Abbildung 28: Hyaluronsäure-Synthese im Herzen 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC) bzw. nach Schein-Operation (3dpSham). Repräsentative Aufnahmen der HABP-Färbung von Paraffinherzschnitten aus dem linken Ventrikel der Gruppen 3dpSham und 3dpTAC nach 4-Methylumbelliferon-Behandlung (4-MU) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (K) (Maßstabsbalken entspricht 200 μ m). Relative Quantifizierung der HABP-positiven braunen Fläche normiert auf die linksventrikuläre Gewebsfläche (LV). Dargestellt als prozentualer Anteil; Mittelwert \pm SEM; n = 5 - 11; <i>one-way</i> ANOVA.	65
Abbildung 29: Plasmakonzentrationsbestimmung von Hyaluronsäure (HA) 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC). Messung erfolgte in Mäusen nach 4-Methylumbelliferon-Behandlung (4-MU) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (K) mittels HA-Bindeprotein <i>Sandwich</i> ELISA-ähnlichem Assay und wurde auf die Blutplasmamenge normiert. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; n = 8; <i>t</i> -Test.	66
Abbildung 30: Kardiale mRNA-Expression von <i>Has2</i> und <i>Has3</i> 3 Tage sowie 7 Wochen nach operativer Aortenstenose (3dpTAC, 7wpTAC) bzw. nach Schein-Operation (3dpSham). Messung erfolgte in Mäusen nach 4-Methylumbelliferon-Behandlung (4-MU) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (K) mittels qPCR. Als Referenzgen wurde <i>Gapdh</i> verwendet. Dargestellt als Vielfaches der Kontrolle (hier: K_3dpSham); Mittelwert \pm SEM; n = 5 - 13; <i>one-way</i> ANOVA; **p < 0,001; ***p < 0,0001; ****p < 0,0001 gegen Kontrolle.	66
Abbildung 31: Hyaluronsäure-Synthese im Herzen 7 Wochen nach operativer Aortenstenose (7wpTAC). Repräsentative Aufnahmen der HABP-Färbung von Paraffinherzschnitten aus dem linken Ventrikel nach 4-Methylumbelliferon-Behandlung (4-MU) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (K) (Maßstabsbalken entspricht 200 μ m). Relative Quantifizierung der Hyaluronsäure-Bindeprotein (HABP)-positiven braunen Fläche normiert auf die linksventrikuläre Gewebsfläche (LV). Dargestellt als prozentualer Anteil; Mittelwert \pm SEM; n = 13; <i>t</i> -Test.	67

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 32: Herzfunktionsanalyse mittels Echokardiographie basal (BL), 2 Wochen sowie 7 Wochen nach operativer Aortenstenose (2wpTAC, 7wpTAC). Vergleich von 4-Methyl-umbelliferone-behandelten Mäusen (4-MU) und unbehandelten Kontrollmäusen (K). Repräsentative Darstellung zur Messung des diastolischen und systolische Innendurchmesser des linken Ventrikels (LVID;d, LVID;s) im parasternalen Kurzschnitt (A). Aufgeführt sind die Quantifizierungen zum systolischen (LVID;s in mm) (B) und diastolischen Innendurchmesser des linken Ventrikels (LVID;d in mm) (C), die Verkürzungsfraktion (FS in %) (D) und das Geschwindigkeitszeit-Integral (VTI in mm) (E). Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; n = 13 - 15; t-Test; *p < 0,05; **p < 0,01; ****p < 0,0001 gegen jeweilige Kontrolle. 69
- Abbildung 33 Kardiale Hypertrophie 7 Wochen nach operativer Aortenstenose (7wpTAC). Vergleich von 4-Methylumbelliferon-behandelten Mäusen (4-MU) und unbehandelten Kontrollmäusen (K). Dargestellt sind das Feuchtherzgewicht, das Trockenherzgewicht, das Verhältnis von Körpergewicht-zu-Feuchtherzgewicht und das von Tibialänge-zu-Feuchtherzgewicht (A). Messung der Expressionsstärke der genetischen Marker für Hypertrophie *Anp*, *Bnp*, *Myh7* und *Myh6* mittels qPCR. Als Referenzgen wurde *Gapdh* verwendet (B). Repräsentative Aufnahmen der *Wheat Germ Agglutinin* (WGA)- und DAPI-Färbung von Paraffinherzschnitten aus dem linken Ventrikel (Maßstabsbalken entspricht 50 μ m). Absolute Quantifizierung der Einzelzellgrößen (in μ m²) von Kardiomyozyten (C). Repräsentativer *Western Blot* von phosphorylierten (pERK1/2) und totalen ERK1/2 (tERK1/2) sowie Quantifizierung der relativen Anteile (D). Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; n = 13; t-Test; *p < 0,05; **p < 0,001; ***p < 0,0001; ****p < 0,0001. 73
- Abbildung 34: Kardiale Fibrose 7 Wochen nach operativer Aortenstenose (7wpTAC). Vergleich von 4-Methylumbelliferon-behandelten Mäusen (4-MU) und unbehandelten Kontrollmäusen (K). Repräsentative Aufnahmen der interstitiellen Fibrose von Paraffinherzschnitten aus dem linken Ventrikel mittels Picro-Sirius-Rot-Färbung (Maßstabsbalken entspricht 200 μ m). Relative Quantifizierung der rot-gefärbten Fläche normiert auf die linksventrikuläre Gewebsfläche (LV) (A). Messung der Expressionsstärke von Vimentin (*Vim*) mittels qPCR. Als Referenzgen wurde *Gapdh* verwendet (B). Repräsentative Aufnahmen der perivaskulären Fibrose von Paraffinherzschnitten aus dem linken Ventrikel mittels Picro-Sirius-Rot-Färbung (Maßstabsbalken entspricht 200 μ m). Relative Quantifizierung der rot-gefärbten Fläche normiert auf die Mediafläche des arteriellen Gefäßes (C). Zur Bestimmung der Gefäßgröße wurde die Mediafläche von drei orthogonal angeschnittenen arteriellen gemessen und gemittelt (D). Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; n = 13; t-Test; n. s. (nicht signifikant) p > 0,05; *p < 0,05; **p < 0,001. 76
- Abbildung 35: Kardiale mRNA-Expression von Entzündungsmarkern 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC) bzw. nach Schein-Operation (3dpSham). Messung der Expressionsstärke der Liganden *Ccl2*, *Ccl5*, *Cx3cl1*, *Cxcl1* und *IL-1 β* (A) sowie der Rezeptoren *Ccr2*, *Ccr5* und *Cxcr1* (B) mittels qPCR. Als Referenzgen wurde *Gapdh* verwendet. Dargestellt als Vielfaches der Kontrolle (K, hier: 3dpSham); Mittelwert \pm SEM; n = 5 - 11; t-Test; *p < 0,05 oder mit jeweiligem P-Wert vermerkt. 78
- Abbildung 36: Makrophagen-Infiltration im Herzen 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC). Vergleich von 4-Methylumbelliferon-behandelten Mäusen (4-MU) und unbehandelten Kontrollmäusen (K). Repräsentative Aufnahmen der Mac-2-Färbung von Paraffinherzschnitten aus dem linken Ventrikel (Maßstabsbalken entspricht 200 μ m). Relative Quantifizierung der Mac-2-positiven braunen Fläche normiert auf die linksventrikuläre Gewebsfläche (LV). Dargestellt als prozentualer Anteil; Mittelwert \pm SEM; n = 11; t-Test; *p < 0,05. 79

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 37: Herzgewicht, Gesamtzellzahl, Vitalität der untersuchten Zellen und relativer Anteil der Erythrozyten von durchflusszytometrisch untersuchten Herzen 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC). Es wurden 4-Methylumbelliferon-behandelte Mäuse (4-MU) gegen unbehandelte Kontrollmäuse (K) verglichen. Das Herzgewicht ist als Feuchtgewicht bei Organentnahme angegeben (A). Absolute Quantifizierung der Gesamtzellzahl pro Herz (B). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der lebenden Zellen normiert auf die Gesamtzellzahl (C). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der TER119⁺-Erythrozyten normiert auf die Gesamtzellzahl (D). Mittelwert ± SEM; n = 8; *t*-Test..... 80
- Abbildung 38: Durchflusszytometrische Analyse von Leukozyten aus dem Herzen 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC). Es wurden 4-Methylumbelliferon-behandelte Mäuse (4-MU) gegen unbehandelte Kontrollmäuse (K) verglichen. Absolute Quantifizierung der CD45⁺-Leukozyten pro Herz (A). Absolute Quantifizierung der CD45⁺ CD11b⁻-Lymphozyten pro Herz (B). Absolute Quantifizierung der CD45⁺ CD11b⁺-Zellen myeloiden Ursprungs pro Herz (C). Mittelwert ± SEM; n = 8; *t*-Test..... 81
- Abbildung 39: Durchflusszytometrische Analyse der myeloiden Zellen im Herzen 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC). Es wurden 4-Methylumbelliferon-behandelte Mäuse (4-MU) gegen unbehandelte Kontrollmäuse (K) verglichen. Absolute Quantifizierung der CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁺-Neutrophilen pro Herz (A). Absolute Quantifizierung der CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁻ F4/80⁻ CD11c⁻-Monozyten pro Herz (B). Absolute Quantifizierung der CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁻ F4/80⁺-Makrophagen pro Herz (C). Mittelwert ± SEM; n = 8; *t*-Test..... 82
- Abbildung 40: Durchflusszytometrische Analyse der Makrophagen im Herzen 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC). Es wurden 4-Methylumbelliferon-behandelte Mäuse (4-MU) gegen unbehandelte Kontrollmäuse (K) verglichen. Absolute Quantifizierung der Ly6C^{low}-Makrophagen pro Herz (A). Absolute Quantifizierung der Ly6C^{int}-Makrophagen pro Herz (B). Absolute Quantifizierung der Ly6C^{high}-Makrophagen pro Herz (C). Absolute Quantifizierung der MHCII⁺-Makrophagen pro Herz (D). Mittelwert ± SEM; n = 8; *t*-Test..... 83
- Abbildung 41: Durchflusszytometrische Analyse von zirkulierenden Leukozyten präoperativ (präOP) und 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC). Es wurden 4-Methylumbelliferon-behandelte Mäuse (4-MU) gegen unbehandelte Kontrollmäuse (K) verglichen. Absolute Quantifizierung der CD45⁺-Leukozyten pro µL Blut (A). Absolute Quantifizierung der CD45⁺ CD19⁺ CD3⁺-Lymphozyten pro µL Blut (B). Absolute Quantifizierung der CD45⁺ CD11b⁺-Zellen myeloiden Ursprungs pro µL Blut (C). Relative Quantifizierung der CD45⁺ CD19⁺ CD3⁺-Lymphozyten normiert auf die Gesamtzellzahl der Leukozyten (D). Relative Quantifizierung der CD45⁺ CD11b⁺-Zellen myeloiden Ursprungs normiert auf die Gesamtzellzahl der Leukozyten (E). Mittelwert ± SEM; n = 8; *two-way ANOVA*; **p* < 0,05 4-MU gegen K; #*p* < 0,05 präOP^K gegen 3dpTAC^K; \$*p* < 0,05 präOP^{4-MU} gegen 3dpTAC^{4-MU}.. 85
- Abbildung 42: Durchflusszytometrische Analyse von zirkulierenden Lymphozyten präoperativ (präOP) und 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC). Es wurden 4-Methylumbelliferon-behandelte Mäuse (4-MU) gegen unbehandelte Kontrollmäuse (K) verglichen. Relative Quantifizierung der CD19⁺-B-Zellen normiert auf die Gesamtzellzahl der Leukozyten (A). Relative Quantifizierung der CD3⁺-T-Zellen normiert auf die Gesamtzellzahl der Leukozyten (B). Relative Quantifizierung der CD3⁺ CD4⁺-T-Helferzellen (T_H-Zellen) normiert auf die Gesamtzellzahl der Leukozyten (C). Relative Quantifizierung der CD3⁺ CD8a⁺-zytotoxischen T-Zellen (CTL) normiert auf die Gesamtzellzahl der Leukozyten (D). Mittelwert ± SEM; n = 8; *two-way ANOVA*; **p* < 0,05 4-MU gegen K; #*p* < 0,05 präOP^K gegen 3dpTAC^K..... 86
- Abbildung 43: Durchflusszytometrische Analyse von zirkulierenden myeloiden Zellen präoperativ (präOP) und 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC). Es wurden 4-Methylumbelliferon-behandelte Mäuse (4-MU) gegen unbehandelte Kontrollmäuse (K) verglichen. Absolute Quantifizierung der CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁺-Neutrophilen pro µL Blut (A). Absolute Quantifizierung der CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁻ F4/80⁻ CD11c⁻-Monozyten pro µL Blut (B). Absolute Quantifizierung der Ly6C^{low}-Monozyten pro µL Blut (C). Absolute Quantifizierung der Ly6C^{int}-Monozyten pro µL Blut (D). Absolute Quantifizierung der Ly6C^{high}-Monozyten pro µL Blut (E). Mittelwert ± SEM; n = 8; *two-way ANOVA*; **p* < 0,05 4-MU gegen K; #*p* < 0,05 präOP^K gegen 3dpTAC^K; \$*p* < 0,05 präOP^{4-MU} gegen 3dpTAC^{4-MU}.. 88

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 44: Schaubild eines Modells für den zugrundeliegenden Mechanismus von 4-Methylumbelliferon (4-MU) nach chronischer Druckbelastung. Die durch die operative Aortenstenose verursachte chronische Druckbelastung führt zu einer Induktion der *Has2*-Genexpression. Damit wird der Aufbau einer Hyaluronsäure (HA)-reichen Extrazellulärmatrix begünstigt. Eine 4-MU-Behandlung hemmt die HA-Synthese. Somit wird das CD44-vermittelte HA-*signaling* in Immunzellen reduziert, sodass weniger Zyto- und Chemokine (IL-1 β und CCL2) ausgeschüttet werden und die T-Zell-Expansion langfristig inhibiert wird. Die Fibroblasten-Aktivierung wird in Folge dessen gehemmt, die durch eine reduzierte Fibrose-Entwicklung in Erscheinung tritt. Die Fibroblasten sezernieren demnach weniger Wachstumsfaktoren (FGF-2 und IGF-2), die eine Hypertrophie-Entwicklung in Kardiomyozyten induzieren. Das moderate myokardiale *Remodeling* unter 4-MU-Behandlung wirkt sich günstig auf die Herzfunktion aus. 107
- Abbildung 45: Kardiale mRNA-Expression von *Has1* 3 Tage sowie 7 Wochen nach operativer Aortenstenose (3dpTAC, 7wpTAC) bzw. nach Schein-Operation (3dpSham). Messung der Expressionsstärke erfolgte in Mäusen nach 4-Methylumbelliferon-Behandlung (4-MU) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (K) mittels qPCR. Als Referenzgen wurde *Gapdh* verwendet. Dargestellt als Vielfaches der Kontrolle (hier: K_3dpSham); Mittelwert \pm SEM; n = 5 - 13; *one-way* ANOVA. 123
- Abbildung 46: Feuchtherzgewicht 3 Tage nach operativer Aortenstenose bzw. nach Schein-Operation (3dpSham). Verglichen wurde das Herzgewicht von 4-Methylumbelliferon-behandelten Mäusen (4-MU) und unbehandelten Kontrollmäusen (K) bei Versuchsende. Das durchschnittliche Feuchtherzgewicht der Kontrolle (K_3dpSham) beträgt 106,1 mg. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; n = 5 - 11; *one-way* ANOVA; *p < 0,05; **p < 0,001 gegen Kontrolle. 124
- Abbildung 47: Phosphorylierung von ERK1/2 im Herzen 7 Wochen nach operativer Aortenstenose (7wpTAC). Vergleich von 4-Methylumbelliferon-behandelten Mäusen (4-MU) und unbehandelten Kontrollmäusen (K). Repräsentativer *Western Blot* von phosphorylierten (pERK1/2) und totalen ERK1/2 (tERK1/2) sowie Quantifizierung der relativen Anteile. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; n = 11; *t*-Test. 124
- Abbildung 48: Kardiale mRNA-Expression von Fibrose-assoziierten Genen 7 Wochen nach operativer Aortenstenose (7wpTAC). Messung der Expressionsstärke von *Col1a1*, *Col3a1*, *α -Sma*, *Mmp2*, *Fn1*, *Timp3* sowie *Tn-c* erfolgte in Mäusen nach 4-Methylumbelliferon-Behandlung (4-MU) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (K) mittels qPCR. Als Referenzgen wurde *Gapdh* verwendet. Dargestellt als Vielfaches der Kontrolle; Mittelwert \pm SEM; n = 13; *t*-Test. 125
- Abbildung 49: Kardiale mRNA-Expression von Entzündungsmarkern 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC) bzw. nach Schein-Operation (3dpSham). Messung der Expressionsstärke der Liganden *Ccl2*, *Ccl5*, *Cx3cl1*, *Cxcl1* und *IL-1 β* (A) sowie der Rezeptoren *Ccr2*, *Ccr5* und *Cxcr1* (B) erfolgte in Mäusen nach 4-Methylumbelliferon-Behandlung (4-MU) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (K) mittels qPCR. Als Referenzgen wurde *Gapdh* verwendet. Dargestellt als Vielfaches der Kontrolle (hier: K_3dpSham); Mittelwert \pm SEM; n = 5 - 11; *one-way* ANOVA. 126
- Abbildung 50: Kardiale mRNA-Expression von Entzündungsmarkern 7 Wochen nach operativer Aortenstenose (7wpTAC). Messung der Expressionsstärke der Liganden *Ccl2*, *Ccl5*, *Cx3cl1*, *Cxcl1* und *IL-1 β* (A) sowie der Rezeptoren *Ccr2*, *Ccr5* und *Cxcr1* (B) erfolgte in Mäusen nach 4-Methylumbelliferon-Behandlung (4-MU) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (K) mittels qPCR. Als Referenzgen wurde *Gapdh* verwendet. Dargestellt als Vielfaches der Kontrolle; Mittelwert \pm SEM; n = 13; *t*-Test; *p < 0,05. 127

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Feinchemikalien, Medien, Lösungen und <i>Kits</i> . Nach alphabetischer Reihenfolge sortiert.	19
Tabelle 2: Liste der verwendeten Antikörper für <i>Western Blot</i> , immunhistochemische Färbungen und Durchflusszytometrie.....	21
Tabelle 3: Liste der verwendeten Mausstämme.	22
Tabelle 4: Verwendete murine Primersequenzen für qPCR. Gene als Gensymbole abgekürzt.	35
Tabelle 5: Kategorieale Anreicherungsanalyse: TOP10-Rangliste der GO <i>terms</i> für zelluläres Kompartiment (GOCC). In die Analyse sind Transkripte eingegangen, die im Vergleich der VM/RC-Mausherzen zu Wildtyp-Mausherzen (n = 3-4; p < 0,05) eine veränderte Expression aufwiesen.	42
Tabelle 6: Kategorieale Anreicherungsanalyse: TOP10-Rangliste der GO <i>terms</i> für biologische Prozesse (GOBP). In die Analyse sind Transkripte eingegangen, die im Vergleich der VM/RC-Mausherzen zu Wildtyp-Mausherzen (n = 3-4; p < 0,05) eine veränderte Expression aufwiesen.	43
Tabelle 7: Kategorieale Anreicherungsanalyse: TOP10-Rangliste der GO <i>terms</i> für molekulare Funktion (GOMF). In die Analyse sind Transkripte eingegangen, die im Vergleich der VM/RC-Mausherzen zu Wildtyp-Mausherzen (n = 3-4; p < 0,05) eine veränderte Expression aufwiesen.	44
Tabelle 8: Kategorieale Anreicherungsanalyse: TOP10-Rangliste der GO <i>terms</i> für zelluläres Kompartiment (GOCC). In die Analyse sind Proteine eingegangen, die im Vergleich der VM/RC-Mausherzen zu Wildtyp-Mausherzen (n = 6) eine veränderte Abundanz aufwiesen.	47
Tabelle 9: Kategorieale Anreicherungsanalyse: TOP10-Rangliste der GO <i>terms</i> für biologische Prozesse (GOBP). In die Analyse sind Proteine eingegangen, die im Vergleich der VM/RC-Mausherzen zu Wildtyp-Mausherzen (n = 6) eine veränderte Abundanz aufwiesen.	49
Tabelle 10: Vergleich von Transkriptom- und Proteom-Daten. Dargestellt sind die absoluten Zahlen der identifizierten und regulierten Transkripte bzw. Proteine unter den jeweiligen statistischen Bedingungen.	51
Tabelle 11: Echokardiographische Parameter basal (BL), 2 Wochen sowie 7 Wochen nach operativer Aortenstenose (2wpTAC, 7wpTAC). Vergleich von 4-Methylumbelliferon-behandelten Mäusen (4-MU) und unbehandelten Kontrollmäusen (K). Aufgeführt sind die jeweiligen Gruppengrößen (n), die Ejektionsfraktion (EF in %), die Verkürzungsfraktion (FS in %), das Geschwindigkeitszeit Integral (VTI in mm), die diastolische und systolische interventrikuläre Wandstärke (IVSd und IVSs in mm), der diastolische und systolische Innendurchmesser des linken Ventrikels (LVIDd und LVIDs in mm), die diastolische und systolische Hinterwanddicke (PWTd und PWTs in mm) und die berechnete Herzmuskelmasse des linken Ventrikels (<i>calc. LV mass</i> in mg). Dargestellt als Mittelwert ± SEM; n = 13 - 15; t-Test; *p < 0,05 gegen jeweilige Kontrolle.....	71
Tabelle 12: Futterzusammensetzung. Das Futter der 4-Methylumbelliferon (4-MU)-behandelten Mäuse und der Kontrollmäuse wurde zusätzlich mit Schokoladenaroma und weiteren ernährungsphysiologischen Zusatzstoffen supplementiert. 4-MU wurde in einer Konzentration von 50 g pro kg Futter zugesetzt.	123

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	von
2wpTAC	2 Wochen nach TAC-OP, englisch: <i>2 weeks post TAC</i>
3dpSham	3 Tage nach Schein-OP, englisch: <i>3 days post sham</i>
3dpTAC	3 Tage nach TAC-OP, englisch: <i>3 days post TAC</i>
4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MU-GlcA	glukuronidiertes 4-MU
4-MU-S	sulfatiertes 4-MU
7wpTAC	7 Wochen nach TAC-OP, englisch: <i>7 weeks post TAC</i>
ANOVA	<i>one-way analysis of variance</i>
BL	basal
calc. LV mass	berechnete Herzmuskelmasse des linken Ventrikels
CCL	<i>chemokine (C-C motif) ligand</i>
CCR	<i>chemokine (C-C motif) receptor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CTL	zytotoxischen T-Zellen, englisch: <i>cytotoxic T lymphocytes</i>
CXCL	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
CXCR	<i>chemokine (C-X-C motif) receptor</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
EDV	linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
ESV	linksventrikuläres endsystolisches Volumen
EZM	Extrazellulärmatrix
FDR	<i>false discovery rate</i>
FS	Verkürzungsfraction, englisch: <i>fractional shortening</i>
GlcA	D-Glukuronsäure, englisch: <i>glucuronic acid</i>
GlcNAc	N-Acetyl-D-Glukosamin, englisch: <i>N-acetylglucosamine</i>
GO	Gen-Ontologien
GOBP	GO <i>terms</i> für biologische Prozesse
GOCC	GO <i>terms</i> für zelluläres Kompartiment
GOMF	GO <i>terms</i> für molekulare Funktion
HA	Hyaluronsäure, englisch: <i>hyaluronic acid</i>
HABP	Hyaluronsäure-Bindeproteins

Abkürzungsverzeichnis

HAS	Hyaluronsäure-Synthase
HMW-HA	hochmolekulare HA, englisch: <i>high molecular weight HA</i>
HYAL	Hyaluronidasen
HZV	Herzzeitvolumen
Iso	Isoprenalin
IVS	interventrikuläre Wandstärke
K	Kontrolle
LMW-HA	niedermolekulare HA, englisch: <i>low molecular weight HA</i>
LV	linker Ventrikel
LVIDd	linksventrikulärer enddiastolischer innerer Durchmesser
LVIDs	linksventrikulärer endsystolischer innerer Durchmesser
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
n. s.	nicht signifikant
OE	Organentnahme
OP	Operation
PG_{max}	maximale Druckgradient, englisch: <i>maximal pressure gradient</i>
PWT	Hinterwanddicke, englisch: <i>posterior wall thickness</i>
qPCR	quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RC/+	Arginin 453 Cystein Punktmutation in <i>Myh6</i> -Gen
RM	<i>repeated measures</i>
ROI	<i>region of interest</i>
ROS	reaktiver Sauerstoffspezien, englisch: <i>reactive oxygen species</i>
SEM	Standardfehler, englisch: <i>standard error of the mean</i>
sham	scheinoperiert
SV	Schlagvolumen
TAC	operative Aortenstenose, englisch: <i>transverse aortic constriction</i>
T_H-Zellen	T-Helferzellen
t-Test	<i>Student's t-test</i>
VM/+	Valin 606 Methionin Punktmutation in <i>Myh6</i> -Gen
VM/RC	kombinierten Heterozygotie der Punktmutationen VM/+ und RC/+ in <i>Myh6</i> -Gen
VTI	Geschwindigkeitszeit-Integral, englisch: <i>velocity time integral</i>
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Hypertrophie des Herzens

Mit Hypertrophie bezeichnet man im Herzen eine Vergrößerung der Herzmuskelzellen, die eine Zunahme der Herzmuskelmasse zur Folge hat. Die physiologische Hypertrophie, beispielsweise bei Ausdauersportlern, Schwangeren oder Kindern, ist eine physiologische Adaptation an gesteigerte kardiovaskuläre Belastungen. Sie ist mit einer uneingeschränkten Herzfunktion assoziiert und von der pathologischen Hypertrophie abzugrenzen. Letztere wird grundsätzlich durch kardiale Noxen verursacht, der unterschiedliche Ätiologien zugrunde liegen können. Hier zu nennen sind genetische Formen, zum Beispiel die familiäre hypertrophische Kardiomyopathie, und erworbene Formen, wie etwa Herzklappenerkrankungen, Myokardinfarkt oder Herzmuskelentzündungen [1, 2]. Die hypertrophische Kardiomyopathie (englisch: *hypertrophic cardiomyopathy*, HCM) wird durch Mutationen in Sarkomer-Proteinen ausgelöst und ist mit einer Prävalenz von mindestens 1 : 500 die häufigste hereditäre Herzerkrankung [3]. Eine Hypertrophie des Herzens wird jedoch hauptsächlich durch einen arteriellen Hypertonus verursacht, von dem laut Weltgesundheitsorganisation über 20 % der Bevölkerung betroffen sind. Er ist zudem als Hochrisikofaktor für Schlaganfall und Herz-Kreislauf-Erkrankungen beschrieben, welche weltweit die Haupttodesursache darstellen [4]. Die linksventrikuläre Hypertrophie korreliert außerdem mit einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität (2,3-fach erhöhtes relatives Risiko) und mit einer erhöhten allgemeinen Sterblichkeit (2,5-fach erhöhtes relatives Risiko) [5].

Damit spielt die Myokardhypertrophie durch Beteiligung in vielen verschiedenen kardialen Krankheitsbildern eine wichtige Rolle und ist epidemiologisch von hoher Bedeutung. Da die pathophysiologischen Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt sind, besteht noch weiterer Forschungsbedarf.

Nachfolgend wird der aktuelle Stand zur pathologischen Myokardhypertrophie vorgestellt im Hinblick auf Pathogenese, klinische Symptomatik, Diagnostik, Therapiemöglichkeiten sowie experimentelle Modelle *in vitro* und *in vivo*.

1.1.1 Pathogenese

Die Ursachen einer Myokardhypertrophie sind wie bereits erwähnt sehr vielfältig. Sie haben jedoch alle eine kardiale Schädigung zur Folge, die mit einem Zelluntergang von Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) einhergeht. Da der überwiegende Teil der Kardiomyozyten teilungsunfähig ist, kann das Herz dem Verlust von Kardiomyozyten sowie

Einleitung

einer gesteigerten mechanischen Belastung nicht durch Zellproliferation entgegenwirken. Stattdessen vergrößert sich die Zellmasse der Kardiomyozyten im Sinne einer kompensatorischen Hypertrophie. Gemäß dem physikalischen Gesetz von Laplace, ist die Wandspannung umgekehrt proportional zur Wanddicke eines Hohlorgans, hier das Herz. Das hypertrophische *Remodeling* führt also durch Wandverdickung zu einer Reduktion der ventrikulären Wandspannung und zu einer Entlastung des Herzens [6, 7]. Während dieser adaptiven Phase liegt die kardiale Funktion zunächst gesichert vor und äußert sich klinisch bzw. symptomatisch unauffällig. Dennoch finden in dieser Phase bereits zelluläre, morphologische sowie funktionelle Veränderungen statt (Abbildung 1).

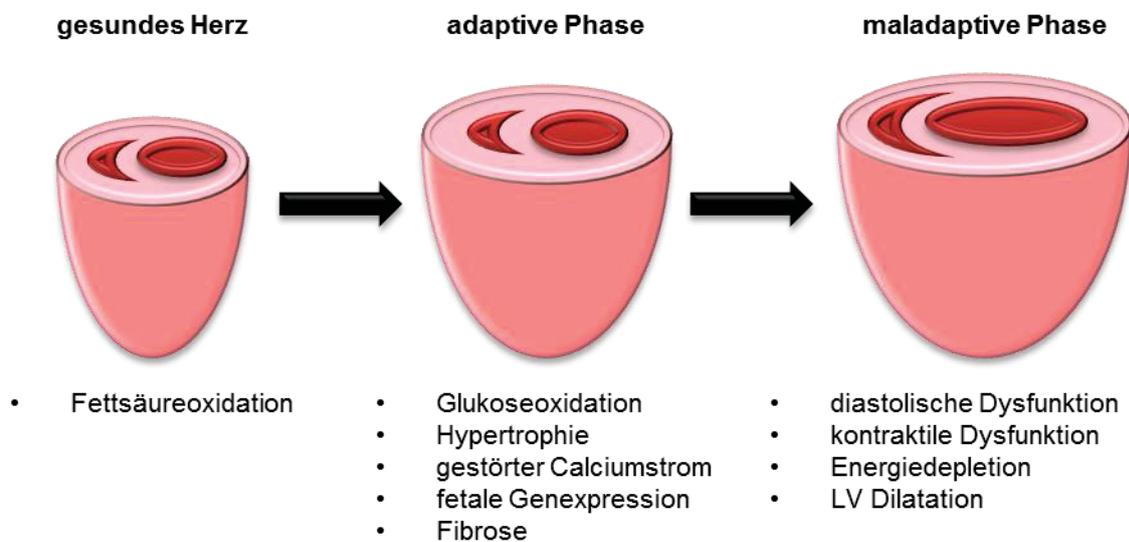


Abbildung 1: Schematische Darstellung der pathophysiologischen Prozesse bei hypertrophischem *Remodeling*. Dargestellt sind die morphologischen, molekularen und biochemischen Veränderungen während der adaptiven und maladaptiven Phase. Abbildung modifiziert nach [8].

Während chronischer Druckbelastung sind die Herzmuskelzellen mechanischem Stress und anderen neurohumoralen Faktoren, insbesondere Angiotensin II (Ang II), Endothelin-1 (ET-1), *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), Transformierender Wachstumsfaktor- β (englisch: *transforming growth factor β* , TGF- β) und Cardiotrophin-1 (CT-1), ausgesetzt. Durch Bindung dieser Faktoren an membranständige Rezeptoren werden in den Kardiomyozyten intrazelluläre Signalwege aktiviert, die eine hypertrophische Zellantwort bewirken [9]. Es wurden bereits viele verschiedene und komplexe Signalkaskaden im Kontext der Myokardhypertrophie identifiziert, wie z. B.:

- Calcineurin / *nuclear factor of activated T cells* (NFAT),
- Phosphoinositid-3-Kinasen / Proteinkinase B / Glykogensynthasekinase-3 (PI3K / Akt / GSK-3) und
- *mitogen-activated protein kinase* (MAPK).

Einleitung

Eine Gemeinsamkeit dieser Signaltransduktionen ist, dass der Reiz nach Hypertrophie-Stimulation bis in den Zellkern vermittelt wird. Hier führt es zu Veränderungen der Genexpression, die ursächlich für eine hypertrophische Zellantwort sind [10]. Dabei findet eine fetale Reprogrammierung des Genexpressionsprofils im adulten hypertrophierten Herzen statt. Es liegt eine erhöhte Expression von Genen vor, die für die schwere Kette des β -Myosins (englisch: *β -myosin heavy chain*, β -MHC), das skelettmuskuläre α -Aktin, das atriale natriuretische Peptid (ANP) und natriuretisches Peptid Typ B (BNP) kodieren. ANP und BNP fungieren zudem auch als klinischer Marker für eine Hypertrophie oder eine Herzinsuffizienz [9].

Die Myokardhypertrophie resultiert außerdem in einen gestörten Kalziumstrom, der eine wichtige Rolle in der elektromechanischen Kopplung im Herzen spielt. Ursächlich dafür ist eine erniedrigte Expression oder Phosphorylierung wichtiger regulatorischer Proteine, insbesondere die der Kalziumpumpe des sarco-/endoplasmatischen Reticulums (SERCA2a) oder dessen Regulator Phospholamban [11, 12].

Zudem findet während der Myokardhypertrophie eine Umstellung in der Energiegewinnung statt [13]. Unter physiologischen Bedingungen erfolgt die mitochondriale Adenosin-triphosphat (ATP)-Produktion zum Großteil (60 – 90%) durch Oxidation von Fettsäuren um den im Vergleich zu anderen Organen relativ hohen Energiebedarf des Herzens zu decken [14]. Das Herz besitzt jedoch eine hohe Adaptionfähigkeit zur Verwertung anderer Substrate (Glukose oder Laktat) für die Energiegewinnung [15]. Unter pathophysiologischen Bedingungen ist die Herzarbeit während einer ausgeprägten Myokardhypertrophie gesteigert und kongruent dazu auch der Energiebedarf. Durch eine Veränderung der Genexpression und Aktivität von Transkriptionsfaktoren (*peroxisome proliferator-activated receptor- α* , PPAR- α und *PPAR- γ co-activator 1- α* , PGC1- α) wird eine erhöhte Glukose-Aufnahme sowie vermehrte Glukose-Oxidation und einer verminderten Fettsäuren-Oxidation induziert [16].

Das Herz ist zudem nach hypertrophischer Stimulation einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt, der durch Induktion reaktiver Sauerstoffspezies (englisch: *reactive oxygen species*, ROS) in Kardiomyozyten verursacht wird. Hohe ROS-Level sind umgekehrt mit einem pathologischen *Remodeling* assoziiert, das zu Fibrose, kontraktile Dysfunktion und erhöhter Apoptose des Myokards führt [17].

Die genannten molekularen Veränderungen im Herzen führen zu Umbauprozessen in der extrazellulären Matrix (EZM), die sich durch eine erhöhte Kollagenproduktion im Sinne einer kardialen Fibrose manifestieren. Diese kann die Herzfunktion beeinträchtigen und ist daher ebenfalls von hoher klinischer Bedeutung [8]. Dieser Teilaspekt der pathologischen Myokardhypertrophie wird nachfolgend näher betrachtet (1.2).

Es gibt zunehmend wissenschaftliche Belege dafür, dass auch inflammatorische Prozesse während kardialer Hypertrophie an der Pathogenese beteiligt sind. Dabei wird insbesondere

Einleitung

den Makrophagen eine wichtige Rolle beigemessen. In verschiedenen Mausstudien wurde bereits gezeigt, dass sich eine Makrophagen-Depletion günstig auf das kardiale *Remodeling* und die Herzfunktion nach chronischer Druckbelastung auswirkt [18, 19]. Zudem wurde belegt, dass eine Reihe von inflammatorischen Zytokinen, wie zum Beispiel Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-1 β , Interleukin-6 und TGF- β , ebenfalls in Herzinsuffizienz-Patienten erhöht vorliegen und diese mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelieren [20, 21].

Ist die Hypertrophie-Stimulation langanhaltend, wie etwa während einer chronischen Druckbelastung, führen die zuvor genannten Prozesse während der maladaptiven Phase zu einer dekompensierten Herzinsuffizienz. Hoppe *et al.* definieren die Herzinsuffizienz als Unvermögen des Herzens die Körperperipherie genügend mit Blut und Sauerstoff zu versorgen [22]. Zum einen hat die erhöhte Wandstärke des hypertrophierten Herzens sowie die zunehmende Fibrosierung eine erhöhte Steifigkeit zur Folge. Während der Diastole ist keine vollständige Relaxation mehr möglich, die schließlich mit einer gestörten Blutfüllung einhergeht. Man bezeichnet dies auch im Rahmen der Myokardhypertrophie als diastolische Dysfunktion [23]. Zum anderen liegt auch eine kontraktile Dysfunktion vor, die vor allem durch den gestörten Kalziumhaushalt, das pathophysiologische *Remodeling* und einer Energiedepletion bedingt ist. Folglich ist auch eine linksventrikuläre Dilatation zu beobachten.

1.1.2 Symptomatik, Diagnostik und Therapie

Ohne entsprechende (medikamentöse) Intervention mündet die Myokardhypertrophie schließlich in eine dekompensierte Herzinsuffizienz. Die langanhaltende Störung der diastolischen und kontraktilen Herzfunktion äußert sich durch Kurzatmigkeit, Erschöpfung, Brustschmerzen, Herzrasen, Schwindel und Bewusstlosigkeit. Als weitere schwere Komplikationen können außerdem der plötzliche Herztod sowie der ischämische Herzinfarkt eintreten, daher ist eine entsprechende Therapie unabdingbar [24].

Da sich eine Myokardhypertrophie während der adaptiven Phase symptomarm präsentiert, wird eine Diagnose üblicherweise erst verzögert mit Einsetzen einer beginnenden Herzinsuffizienz gestellt. Die Diagnose einer Herzinsuffizienz wird grundsätzlich über bildgebende Verfahren, wie etwa Ultraschalluntersuchung oder Magnetresonanztomographie, gestellt. Aber auch die Ableitung eines Elektrokardiogramms oder labordiagnostische Untersuchungen von kardialen Hypertrophie-Markern, wie zum Beispiel von BNP, sind im Klinikalltag etabliert [25].

Die Therapie erfolgt unter Berücksichtigung der zugrunde liegenden Ursachen der kardialen Hypertrophie, beispielsweise durch Senkung des Bluthochdrucks oder durch operative

Einleitung

Korrektur bei Vorliegen einer Herzklappenerkrankung. Sofern bereits eine chronische Herzinsuffizienz diagnostiziert wurde, erfolgt die Therapie gemäß Leitlinie mit Diuretika, *Angiotensin-converting enzyme* (ACE)-Hemmern und β -Adrenozeptorantagonisten. Seit 2015 ist auch die fixe Kombination eines Angiotensinrezeptor- und Neprilysin-Inhibitors (ARNI) in der Europäischen Union zugelassen. Bezugnehmend auf die Studie PARADIGM-HF Studie war ARNI der Vergleichssubstanz, dem ACE-Hemmer Enalapril, hinsichtlich Todes- und Hospitalisierungsrate überlegen [26]. Trotz dieser neuen Therapiemöglichkeiten ist die Mortalität und Morbidität der Herzinsuffizienz immer noch hoch [27].

Daher besteht großer Forschungsbedarf für neue therapeutische Ansätze. Nachfolgend werden die in dieser Arbeit angewandten experimentellen Hypertrophie-Modelle näher beschrieben.

1.1.3 Experimentelle Hypertrophie-Modelle

Die vielfältigen Ursachen einer Myokardhypertrophie spiegeln sich auch in der Anzahl der verfügbaren Tier- und Zellmodelle wider. In dieser Arbeit wurde der Fokus auf drei Hypertrophie-Modelle gelegt, die in der Literatur als etabliert gelten.

Als *in vitro*-Zellmodell wurden Kardiomyoblasten, die sogenannten H9C2-Zellen, kultiviert und nach Sympathikus-Aktivierung durch Isoprenalin-Stimulation untersucht (1.1.3.1). Zudem wurden transgene Mäuse mit *Knockin*-Mutationen, die eine HCM verursachen, verwendet (1.1.3.2). Für die Hauptstudie wurden schließlich Mäuse nach linksventrikulärer Druckbelastung durch operative Aortenstenose (englisch: *transverse aortic constriction*, TAC) eingesetzt (1.1.3.3).

1.1.3.1 H9C2-Kardiomyoblasten nach Isoprenalin-Stimulation

Die Myokardhypertrophie wird durch Zellvergrößerung von Kardiomyozyten verursacht. Dieser Prozess lässt sich auch an isolierten Herzmuskelzellen rekapitulieren. Die Hypertrophie-Stimulation erfolgt durch die Zugabe von Substanzen mit sympathomimetischer Wirkung, wie etwa Isoprenalin, oder AT II.

Die großen Vorteile eines Zellkulturmodells sind, dass viele experimentelle Bedingungen konstant sind und dass eine genetische Manipulation mittels Transfektion leicht durchführbar ist.

Primäre Kardiomyozyten sind terminal differenziert und gelten als teilungsunfähig, daher ist eine Kultivierung nur kurzfristig möglich ist [28]. Die in dieser Arbeit verwendeten H9C2-Kardiomyoblasten wurden ursprünglich aus dem embryonalen Ventrikel einer BD1X-Ratte

Einleitung

isoliert und immortalisiert [29]. Sie gelten in der Forschung als etabliertes Hypertrophie-Modell, da H9C2-Kardiomyoblasten, ähnlich wie primäre Kardiomyozyten, nach Hypertrophie-Stimulation mit einer Vergrößerung der Zellgröße und erhöhten Genexpression von *Bnp* reagieren [30].

Nachteilig ist jedoch, dass die in der Zellkultur erhobenen Daten in isolierten Zellen außerhalb eines Organismus generiert werden und diese daher schlechter als das *in vivo*-Modell auf die menschliche Physiologie übertragbar sind. Somit ist es dem Tiermodell hinsichtlich klinischer Translation unterlegen [31]. Zudem ist limitierend, dass H9C2-Zellen in Kultur nicht spontan schlagen. Daher sind sie für kontraktionsbasierte Studien, wie zum Beispiel Untersuchungen der elektro-mechanischen Kopplung, ungeeignet. Weiterhin wurde gezeigt, dass H9C2-Zellen morphologisch und hinsichtlich des Genexpressionsprofils große Ähnlichkeiten mit Skelettmuskelzellen aufweisen [28]. Sie eignen sich daher nur bedingt zur Untersuchung kardialer Hypertrophie, sodass der Einsatz weiterer Modelle darin begründet liegt.

1.1.3.2 Mausmodell mit *Knockin*-Mutationen im kardialen Myosin

Die in dieser Arbeit untersuchten transgenen Mäuse dienten als Modell-Organismus für eine HCM, deren Ursache auf Punktmutationen im Gen für das kardiale Myosin zurückzuführen ist. Die HCM gehört der großen Gruppe der Kardiomyopathien an und stellt eine genetisch bedingte Herzkrankheit mit familiärer Häufung dar, die durch verschiedene Mutationen in Kardiomyozyten-spezifischen Sarkomer-Proteinen hervorgerufen wird. Gemäß der *European Society of Cardiology* werden Kardiomyopathien allgemein als Herzmuskelerkrankungen definiert, in denen eine strukturelle und funktionelle Schädigung des Herzens vorliegt. Differential-diagnostisch sei diese von koronaren Herzerkrankungen, Bluthochdruck, Klappenerkrankung oder angeborenem Herzfehler abzugrenzen. Dabei wird eine Einteilung gemäß des morphologischen und funktionellen Phänotyps vorgeschlagen. Sie unterscheiden zwischen der arrhythmogenen rechtsventrikulären, der dilatativen, der hypertrophischen und der restriktiven Kardiomyopathie. Die HCM wird nach Abgrenzung von anderen Herzerkrankungen durch eine vergrößerte ventrikuläre Wandstärke oder eine vergrößerte Herzmuskelmasse charakterisiert [32]. Beim Menschen stellen Mutationen im *MYH7* Gen kodierend für β -MHC mit einer relativen Häufigkeit von 44 % die häufigste Ursache für eine HCM dar [33]. Abhängig von der Lokalisation der Mutation im *MYH7* Gen sind unterschiedliche Phänotypen beschrieben, wie zum Beispiel dilatative Kardiomyopathie oder eine milde sowie schwere Form der HCM [34, 35].

Die Arginin 453 Cystein (RC/+)-Punktmutation ist beispielsweise in der konservierten Motordomäne zwischen der Aktin-Bindungstasche und der ATP-Bindungsregion des

Einleitung

Myosinkopfes lokalisiert [36]. Aufgrund des relativ frühen Krankheitsbeginns mit 100 %-iger Penetranz und der verkürzten Lebenserwartung von etwa 45 Jahren wird diese Mutation mit einer schweren Form der HCM assoziiert [37, 38].

Im Gegensatz dazu ist die Valin 606 Methionin (VM/+)-Punktmutation außerhalb der funktionellen Region des Myosinkopfes lokalisiert und ruft nur eine milde Form der HCM mit uneingeschränkter Lebenserwartung sowie günstigem Krankheitsverlauf hervor (Abbildung 2) [37].

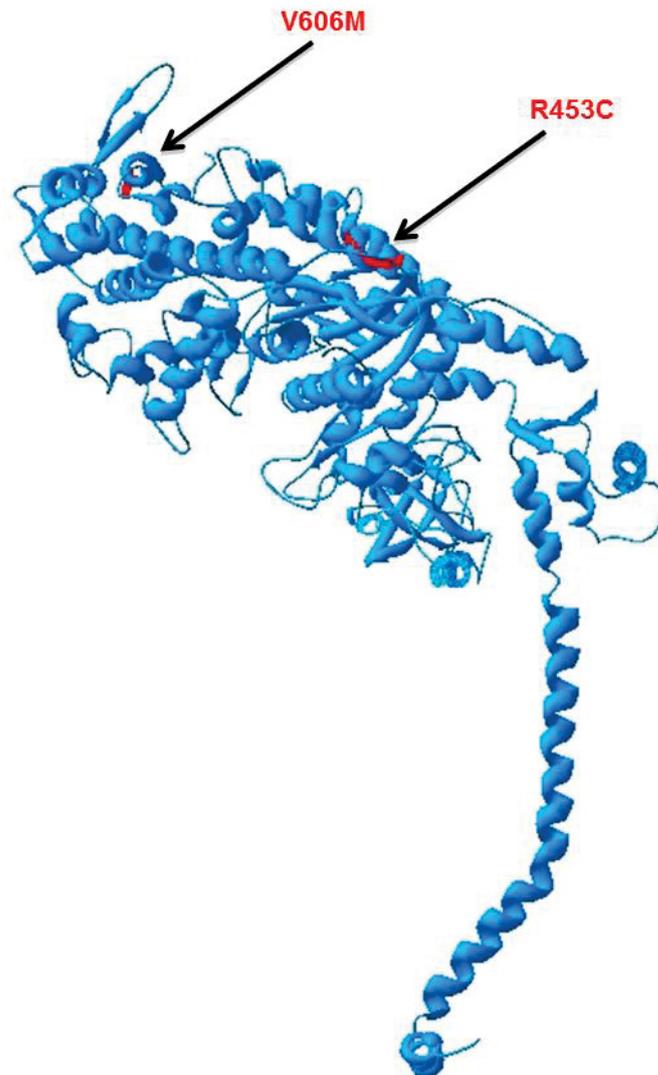


Abbildung 2: Dreidimensionale Darstellung der Kopfdomäne der schweren Myosinkette (Protein Data Bank ID 2MYS). Durch Pfeile gekennzeichnet sind die Lokalisationen der Aminosäuresubstitutionen, Valin 606 Methionin (V606M) und Arginin 453 Cystein (R453C), verursacht durch die HCM-assoziierten Punktmutationen. Die Proteinstruktur wurde unter Verwendung der Software UCSF Chimera 1.13 graphisch abgebildet [39].

Einleitung

Anders als beim Menschen, stellt bei Mäusen mit einer hohen Herzfrequenz die α -Isoform des kardialen Myosins (englisch: *α -myosin heavy chain*, α -MHC), welche vom *Myh6* Gen kodiert wird, die Hauptisoform dar [40]. Es wurde zudem gezeigt, dass diese beiden Isoformen mit einer Aminosäuresequenz-Identität von $\geq 93\%$ eine hohe Homologie aufweisen [41]. Aus diesen Gründen wurden die humanen Mutationen aus dem *MYH7* Gen in das *Myh6* Gen von 129/SvEv-Mäusen gentechnisch eingeführt.

Blankenburg *et al.* generierten ein Mausmodell mit einer kombinierten Heterozygotie der beiden Punktmutationen, (VM/+) und (RC/+). Interessanterweise wurde gezeigt, dass die klinisch eher unauffällige (VM/+)-Mutation in Kombination mit der (RC/+)-Mutation ein frühes Einsetzen des hypertrophischen *Remodeling* zur Folge hat mit schwerem Krankheitsverlauf im Vergleich zu einfach heterozygoten Tieren. Die VM/RC-Mäuse waren durch ein frühes Ableben mit einer durchschnittlichen Lebenserwartung von 62 ± 8 Wochen gekennzeichnet. Sie entwickelten zudem in einem frühen Lebensalter eine starke kardiale Fibrose, die im Vergleich zu einfach heterozygoten (VM/+)-Mäusen 10-fach erhöht war. Auch die kardiale Hypertrophie, gezeigt durch Messung der linksventrikulären Wandstärke, war im Vergleich zu einfach heterozygoten (VM/+)-Mäusen erhöht. Schließlich war auch eine starke Einschränkung der systolischen sowie diastolischen Herzfunktion durch die VM/RC-Mutation mittels echokardiografischer Untersuchung detektierbar. Trotz dieses Synergismus sind die VM/RC-Mäuse lebens- und fortpflanzungsfähig [35]. Dieses Modell hat den Vorteil, dass die Mäuse in einem frühen Lebensalter einen starken HCM-Phänotyp entwickeln.

1.1.3.3 Linksventrikuläre Druckbelastung durch operative Aortenstenose im Mausmodell

Wie bereits erwähnt (1.1), ist der arterielle Hypertonus aufgrund der hohen Inzidenz von großer epidemiologischer und klinischer Bedeutung. Der Forschung stehen verschiedene Tiermodelle zur Verfügung, um einen Bluthochdruck zu induzieren, beispielsweise durch salzhaltige Kost oder durch pharmakologische Behandlung mit dem Vasokonstriktor Ang II. Eine chronische Dauerbehandlung hat eine Myokardhypertrophie zur Folge, die schließlich auch in eine Herzinsuffizienz münden kann [42, 43].

In der Herzforschung hat sich jedoch auch die operative Aortenstenose als Modell etabliert, die im engeren klinischen Sinne primär keinen arteriellen Hypertonus darstellt, weil in peripheren arteriellen Gefäßen der Blutdruck normal ist. Lediglich im Herzen herrscht ein erhöhter Druck infolge einer operativen Stenosierung der Aorta zwischen den Abgängen *Truncus brachiocephalicus* und *Arteria carotis sinistra* (Abbildung 3).

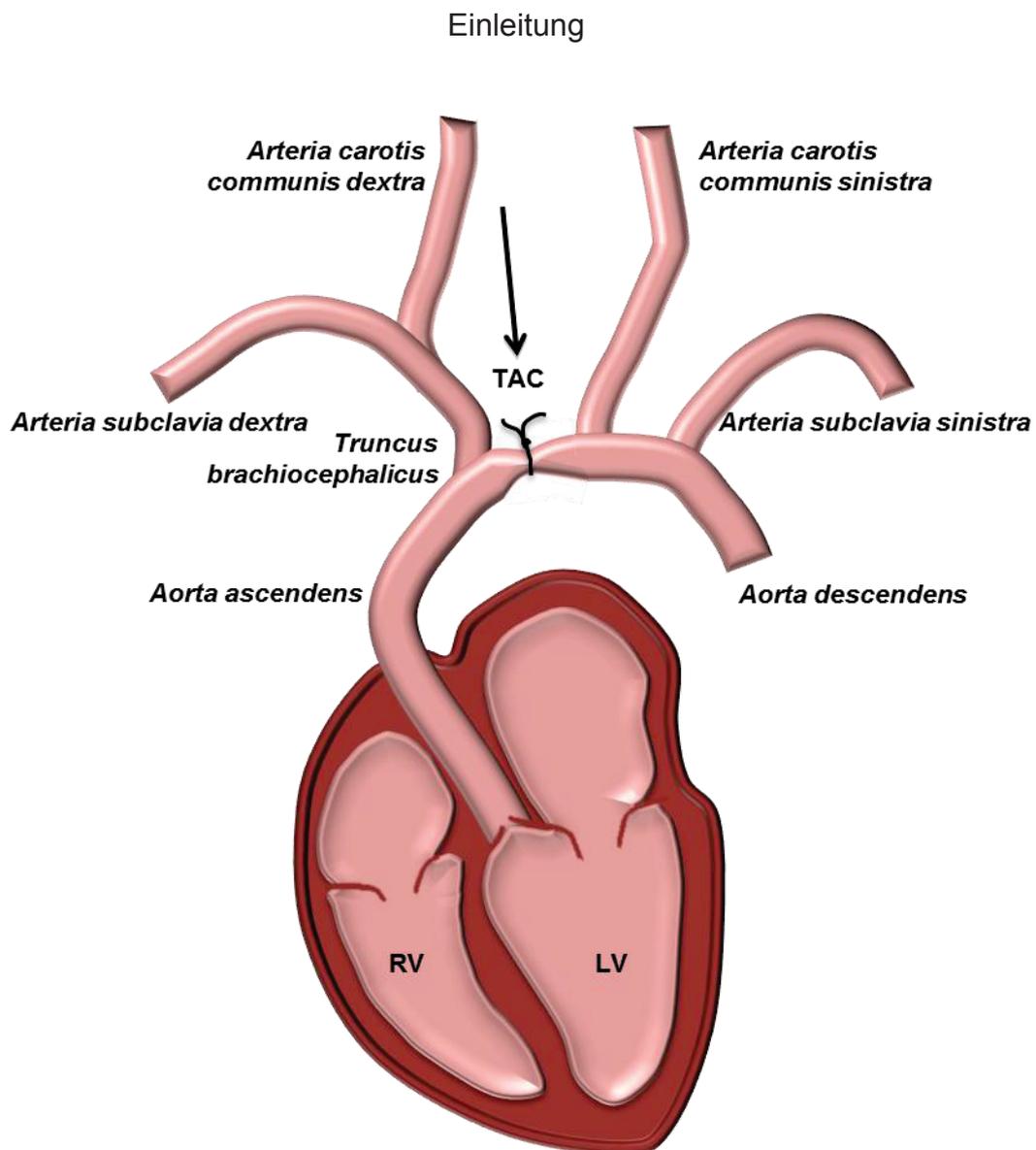


Abbildung 3: Schematische Darstellung der operativen Aortenstenose (TAC). Linker Ventrikel als LV und rechter Ventrikel als RV abgekürzt.

Näheres zum operativen Eingriff ist dem Methoden Teil dieser Arbeit zu entnehmen (2.2.2.2). Die aortale Einengung führt zu einer chronischen linksventrikulären Druckbelastung, die durch erhöhte Wandspannung eine konzentrische Hypertrophie des Herzmuskels zur Folge hat. Rockman *et al.* haben erstmals die TAC als Modell zur Erforschung der pathophysiologischen Prozesse in der Herzinsuffizienz beschrieben [44, 45].

1.2 Rolle der Extrazellulärmatrix während der Myokardhypertrophie

Wie unter 1.1.1 beschrieben, reagiert das Herz während chronischer Druckbelastung mit einer konzentrischen Hypertrophie um die Wandspannung zu reduzieren und eine ausreichende Herzfunktion aufrechtzuerhalten. Begleitet wird dieser Vorgang von Umbauprozessen in der EZM im Rahmen des hypertrophischen *Remodeling*. Nach aktuellem Verständnis sind an der Aktivierung der EZM durch chronische Druckbelastung der Herzkammern mehrere Faktoren und Signalkaskaden beteiligt, die nachfolgend näher beschrieben werden.

Von zentraler Bedeutung ist dabei die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), in Folge derer kardiale Fibroblasten durch neurohumorale Stimulation aktiviert werden [46, 47]. Dadurch wird der Aufbau einer kollagenreichen Matrix begünstigt, die durch eine erhöhte interstitielle sowie perivaskuläre Fibrose in Erscheinung tritt. Dabei liegt vor allem die Genexpression von Kollagen I und III erhöht vor [48]. Eine Aktivierung von Fibroblasten, den sogenannten Myofibroblasten, ist aber auch auf indirektem Wege möglich. So zeigten Nishida *et al.*, dass purinerge Signalwege durch den mechanischen Stimulus während einer Druckbelastung aktiviert werden, die eine verstärkte Aktivierung von TGF- β in Kardiomyozyten zur Folge haben [49]. Ebenso sind Immunzellen, unter anderem Makrophagen, dafür bekannt, Fibroblasten durch Sezernierung von TGF- β und anderen Zytokinen zu aktivieren und pro-fibrotische Prozesse zu fördern [19]. Die aktivierten Myofibroblasten und Makrophagen produzieren außerdem noch weitere extrazelluläre Strukturproteine, wie zum Beispiel Thrombospondin-1, -2 sowie -4, Tenascin-C, Osteopontin, Osteonectin, Periostin und Fibronectin [50]. Letzterer wurde durch seine Beteiligung an der Signalkaskade von Calcineurin und NFAT als ein möglicher Mediator für Hypertrophie in Kardiomyozyten identifiziert [51].

Weiterhin ist beschrieben, dass Makrophagen zudem Matrix-Metalloproteasen (MMPs) produzieren und sekretieren, die durch ihre proteolytische Aktivität Bestandteile der EZM verdauen. Die aus der Proteolyse hervorgegangenen Peptide, die sogenannten Matrikine, akkumulieren in der EZM und entfalten eine pro-inflammatorische Wirkung [52, 53].

Ein zusammenfassendes Schaubild ist nachfolgend dargestellt (Abbildung 4).

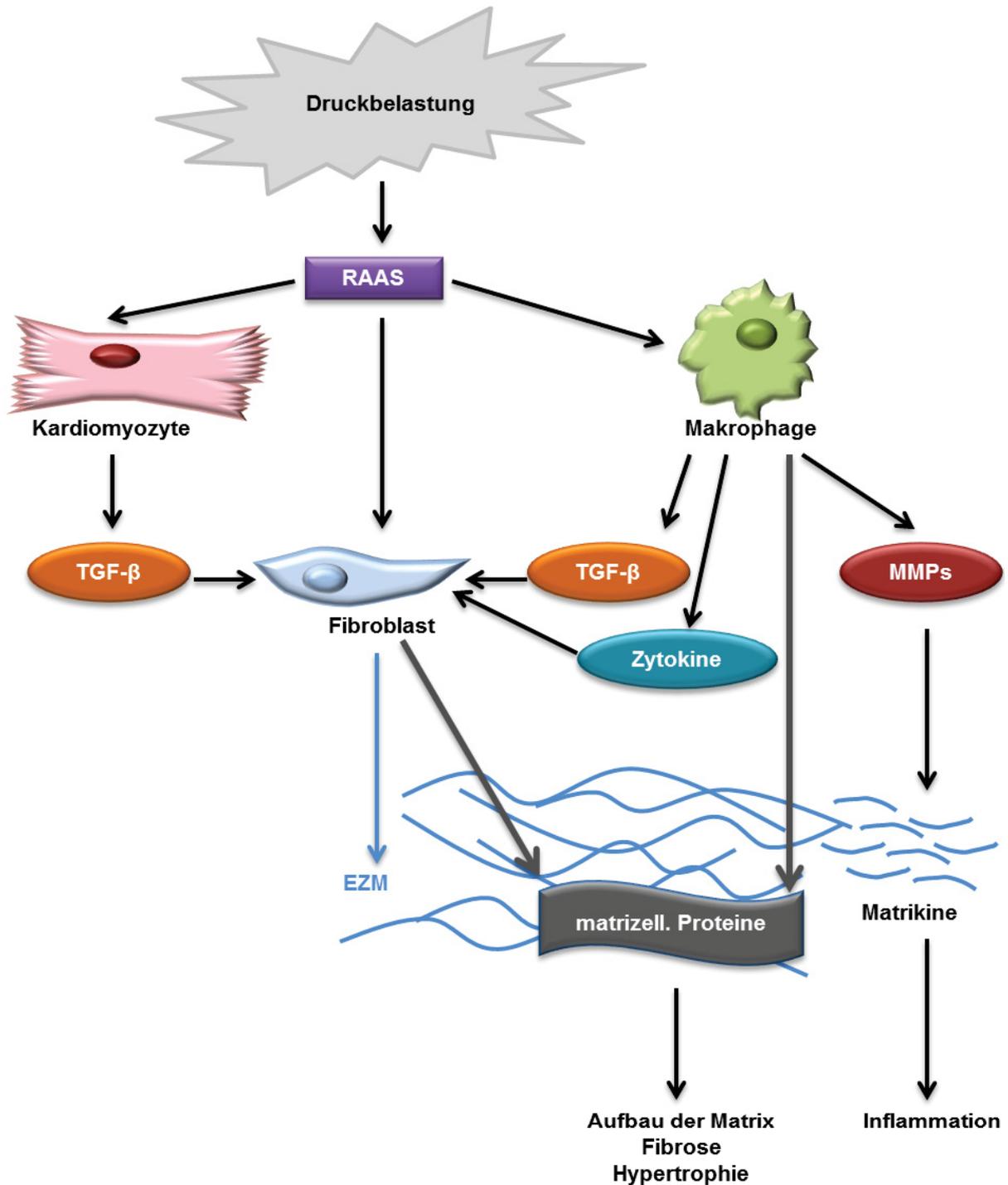


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Umbauprozesse in der Extrazellulärmatrix (EZM) während chronischer Druckbelastung im Herzen. Dargestellt ist die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) vermittelt durch mechanischen Stress nach Druckbelastung. Die Stimulation kardialer Fibroblasten erfolgt durch Zytokine, RAAS und den Transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF- β) und resultiert in Umbauprozesse der EZM. Matrix-Metalloproteasen (MMPs) sind an der Akkumulation von pro-inflammatorischen Matrikinen beteiligt. Abbildung modifiziert nach [50].

1.2.1 Bedeutung der Hyaluronsäure für die Extrazellulärmatrix

Im Rahmen des hypertrophischen *Remodeling* im Herzen spielen Umbauprozesse in der EZM wie zuvor beschrieben eine bedeutende Rolle. Neben den Kollagenen gilt das Glykosaminoglykan Hyaluronsäure (englisch: *hyaluronic acid*, HA) als Hauptbestandteil der EZM [54]. Eine erhöhte HA-Produktion wird grundsätzlich während schneller Umbauprozesse im Gewebe verschiedener Organe beobachtet, wie etwa während der Embryogenese, bei Entzündungsreaktionen oder bei malignen Tumoren [55].

Die HA besteht aus einer makromolekularen Kette mit bis zu 25.000 alternierender Disaccharide, die aus D-Glukuronsäure (englisch: *glucuronic acid*, GlcA) und N-Acetyl-D-Glukosamin (englisch: *N-acetylglucosamine*, GlcNAc) gebildet werden und durch β -1,3- und β -1,4-glykosidisch verknüpft sind (Abbildung 5).

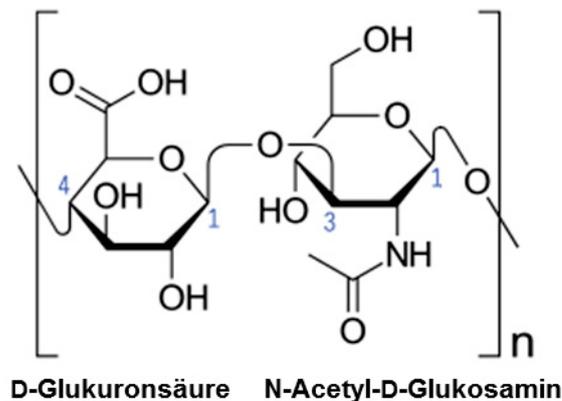


Abbildung 5: Strukturformel der Hyaluronsäure. Die Hyaluronsäure ist ein lineares Molekül bestehend aus alternierenden Disacchariden von D-Glukuronsäure und N-Acetyl-D-Glukosamin.

Im Gegensatz zu anderen Glykosaminoglykanen wird die HA nicht im Golgi-Apparat sondern an der Plasmamembran von der sogenannten Hyaluronsäure-Synthase (HAS) synthetisiert. Dabei werden die zytosolischen Substrate, Uridindiphosphat (UDP)-GlcA und UDP-GlcNAc, unter Abspaltung der UDP-Gruppe miteinander verknüpft und das resultierende HA-Polymer wird in den Extrazellularraum abgegeben. Drei HAS Isoenzyme, HAS1, HAS2 sowie HAS3, sind an der Synthese von HA beteiligt, die hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz in der Klasse der Säugetiere evolutionär konserviert vorliegen [56-58]. Die HA wurde bisher nur in Vertebraten sowie in einigen Bakterienstämmen nachgewiesen. Aufgrund der hohen molekularen Masse und der negativen Ladung besitzt die HA mit einer 1000-fachen Wasserbindungskapazität hygroskopische Eigenschaften [55, 59, 60]. Starke Anreicherungen der HA sind beim Menschen vor allem in der Nabelschnur, Gelenkflüssigkeit, Haut und dem Glaskörper des Auges zu finden, wo es das osmotische Gleichgewicht reguliert [60, 61].

Einleitung

Die hochmolekulare HA (englisch: *high molecular weight HA*, HMW-HA) mit einem Molekulargewicht von bis zu 4000 kDa liegt normalerweise im gesunden Gewebe vor und ist funktionell von der niedermolekularen HA (englisch: *low molecular weight HA*, LMW-HA) mit einem Molekulargewicht von etwa 100-500 kDa abzugrenzen [62]. Die LMW-HA entsteht grundsätzlich im Rahmen einer Gewebsverletzung, während der Tumorgenese oder anderen Entzündungsreaktionen durch enzymatische Spaltung und fungiert dann als Angiogenese-förderndes oder inflammatorisches Signalmolekül [63-66]. Für Makrophagen ist beschrieben, dass sie nach Stimulation durch LMW-HA verschiedene pro-inflammatorische Chemo- und Zytokine (zum Beispiel CCL3, CCL4, CCL5, IL-12 und Interferon- β) sekretieren [67-69]. Diese und andere Effekte werden über eine Bindung von HMW- und LMW-HA mit zahlreichen membrangebundenen Rezeptoren vermittelt, die eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen (Abbildung 6).

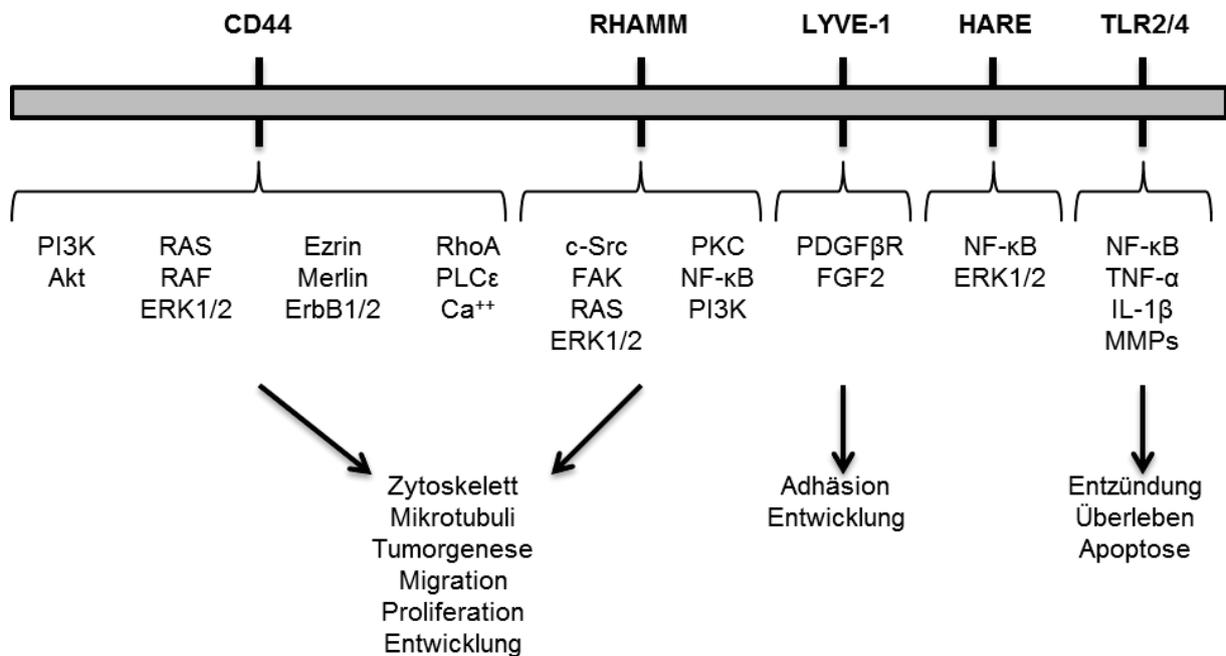


Abbildung 6: Schematische Darstellung der membranständigen Hyaluronsäure-Rezeptoren. Dargestellt sind intrazelluläre Signalkaskaden und die damit verbundenen Effekte auf Zell- und Gewebefunktion. Abbildung modifiziert nach [62].

Hier zu nennen ist der CD44-Rezeptor, der hauptsächlich an der HA-Signaltransduktion beteiligt ist [70]. Auch Signalwege über *Receptor for hyaluronan mediated motility* (RHAMM), *Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1* (LYVE-1), *Hyaluronan receptor for endocytosis* (HARE) und die *Toll-like receptors 2* und 4 (TLR2/4) sind beschrieben [62]. Die HA ist somit als Signalmolekül abhängig von ihrer molekularen Masse an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt und dient nicht nur als Strukturmolekül für die EZM.

Einleitung

Die Wichtigkeit der HA im Herzen wird bei der Betrachtung der Hyaluronsäure-Synthase 2 (*Has2*)-Defizienz im Mausmodell deutlich, die aufgrund einer fehlerhaften kardiovaskulären Morphogenese embryonal letal ist [71]. Weiterhin wurde bei anderen Herzerkrankungen, wie zum Beispiel der Atherosklerose oder dem akuten Myokardinfarkt, bereits gezeigt, dass ein gestörter HA-Metabolismus maßgeblich in die Pathogenese dieser Erkrankungen involviert ist [72, 73].

Im Hypertrophie-Rattenmodell nach operativer Aortenstenose zeigten Hellman *et. al.* eine Korrelation der Genexpression von *Has* und der fetalen Genexpression [60]. Außerdem wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine erhöhte Akkumulation von HA das Membranpotential von Kardiomyozyten beeinflusst und somit möglicherweise an der Entwicklung von Arrhythmien beteiligt sein könnte [74].

Ob der HA auch eine aktive Rolle bei der Entwicklung pathologischer Hypertrophie zukommt, insbesondere beim *Remodeling* der EZM, ist jedoch noch völlig unklar.

1.2.2 Zelluläre Regulation der Hyaluronsäure

Der Bestand und die Länge der HA im Gewebe wird durch ein Gleichgewicht zwischen der HA-Synthese und HA-Degradation reguliert.

Die HA-Synthese wird vor allem durch transkriptionale Regulation der *Has*-Gene beeinflusst. Für den humanen *HAS2*-Promoter wurden Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren *cAMP response element-binding protein* (CREB1), *Retinoic acid receptor* (RAR), *Specificity protein 1* (SP1), *Signal transducer and activator of transcription* (STAT) und *Yin yang 1* (YY1) beschrieben. Diese werden durch externe Stimulation von Wachstumsfaktoren und anderen Zytokinen aktiviert und induzieren die *HAS2*-Expression. Beispiele dafür sind: *Platelet-derived growth factor* (PDGF), *Fibroblast growth factor-2* (FGF-2), *Keratinocyte growth factor* (KGF), *Epidermal growth factor* (EGF), TGF- β , Interleukin-1 β , *Tumor necrosis factor- α* (TNF- α) und Interferon- γ . Posttranskriptionale Modifikationen sind ebenfalls für die *HAS2* beschrieben. Phosphorylierungen, Ubiquitinierungen und O-GlcNAc-Modifikationen beeinflussen die Stabilität und Aktivität der HAS-Isoenzyme. Schließlich ist die Syntheseleistung der HAS auch von einer ausreichenden Bereitstellung der zytosolischen Substrate UDP-GlcA und UDP-GlcNAc abhängig, die als limitierende Faktoren beschrieben sind [75]

Zum anderen sind auch degradierende Prozesse und die damit verbundene Erzeugung von LMW-HA für die Funktion der HA von Bedeutung. Die Hyaluronidasen (HYAL) fassen eine Klasse von hoch homologen Endoglykosidasen zusammen, welche die Hydrolyse der β -1,4-glykosidischen Bindung von HA und dem Glykosaminoglykan Chondroitinsulfat katalysieren, wobei HA-Fragmente unterschiedlicher Kettenlänge entstehen. Sechs Vertreter sind

Einleitung

bekannt: HYAL1-4, PH20 und HYALP1. Als Hauptisoformen sind HYAL1 und HYAL2 im somatischen Gewebe beschrieben und besitzen ein pH-Optimum im sauren Milieu, das vornehmlich während Entzündungsprozessen herrscht [76-78].

Neben dem spezifischen enzymatischen Abbau wird HA auch durch ROS, die vor allem während Entzündungen oder ischämischen Reperfusionsschäden entstehen, fragmentiert [79]. Gao *et al.* zeigten, dass die extrazelluläre Superoxid Dismutase den oxidativen Abbau der HMW-HA durch ROS inhibiert und in Folge dessen die Immunantwort gehemmt wird [80].

Somit stehen vielfältige physiologische Regulationsmechanismen zur Verfügung die HA-Synthese bzw. -Degradation auf transkriptionaler, posttranskriptionaler und zellulärer Ebene zu kontrollieren.

1.2.3 Pharmakologische Inhibition der Hyaluronsäure-Synthese durch 4-Methylumbelliferon

Um die HA-Synthese für wissenschaftliche Zwecke im Tiermodell zu manipulieren, stehen noch weitere Möglichkeiten zur Verfügung, wie zum Beispiel ein genetischer *Knockout* der HAS oder eine pharmakologische Intervention mittels 4-Methylumbelliferon (4-MU).

Das 7-Hydroxycumarin-(Umbelliferon)-Derivat 4-MU war bis 2015 in Deutschland unter den Handelsnamen Cholspamin® forte und Chol-Spasmolekten® als Arzneimittel zur Therapie von Dyskinesien der ableitenden Gallenwege zugelassen (Abbildung 7). Der zugrundeliegende Mechanismus beruht auf dem aktiven Transport der Abbauprodukte von 4-MU aus der Galle, der an einen Export von Natrium- und Kaliumionen gekoppelt ist. Infolge des osmotischen Gradienten wird parallel dazu Wasser passiv aus der Galle ausgeschieden, woraus sich die choleretische sowie spasmolytische Wirkung von 4-MU ableitet [81]. Die übliche Tagesdosis beträgt bei oraler Einnahme 1200 mg [82]. Bei dieser Einnahmeform gilt es nach aktuellem Wissensstand generell als gesundheitlich unbedenklich und gut verträglich [83]. Im Rahmen des Arzneimittelzulassungsverfahrens wurde eine toxikologische Unbedenklichkeit für 4-MU bereits hinreichend belegt.



Abbildung 7: Strukturformel von 4-Methylumbelliferon (4-MU). 4-MU ist ein 7-Hydroxycumarin-(Umbelliferon)-Derivat.

Einleitung

4-MU ist keine natürlich vorkommende Substanz, lediglich das Umbelliferon als Coumarin-Derivat ist im Reich der Pflanzen vertreten, wie zum Beispiel in Engelwurz, Liebstöckel, Kamille oder Lavendel [84].

In der Wissenschaft wird 4-MU jedoch häufig aufgrund seiner hemmenden Wirkung auf die HA-Synthese verwendet [85]. Es gilt als erwiesen, dass 4-MU als kompetitives Substrat anstelle eines UDP's durch die UDP-Glukuronosyltransferase (UGT) glucuronidiert wird, sodass der zytosolische UDP-GlcA-Pool depletiert wird (Abbildung 8). Die Substratverarmung führt somit zu einer dosisabhängigen Hemmung der HA-Synthese [86]. Glucuronidiertes 4-MU (4-MU-GlcA) wird hauptsächlich renal eliminiert [87].

Die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) für die UGT und die HAS wurde in kultivierten Tumorzellen bestimmt und beträgt für beide Enzyme zwischen 100 und 200 μM . Dies entspricht der benötigten Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit eines Enzyms erreicht ist. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von 4-MU befand sich daher ebenso in einem ähnlich hohen Konzentrationsbereich (400 μM) [88].

Es wird spekuliert, dass die spezifische inhibitorische Wirkung von 4-MU auf die HA-Synthese darin begründet liegt, dass die verfügbaren UDP-GlcA durch hochaffine Transporter in den Golgi-Apparat transportiert werden und dort angereichert vorliegen. Somit steht für die Synthese der anderen Glykosaminoglykane, Chondroitinsulfat und Heparansulfat, ausreichend Substrat zur Verfügung, während die Synthese der HA an der Plasmamembran spezifisch gehemmt wird [86, 89].

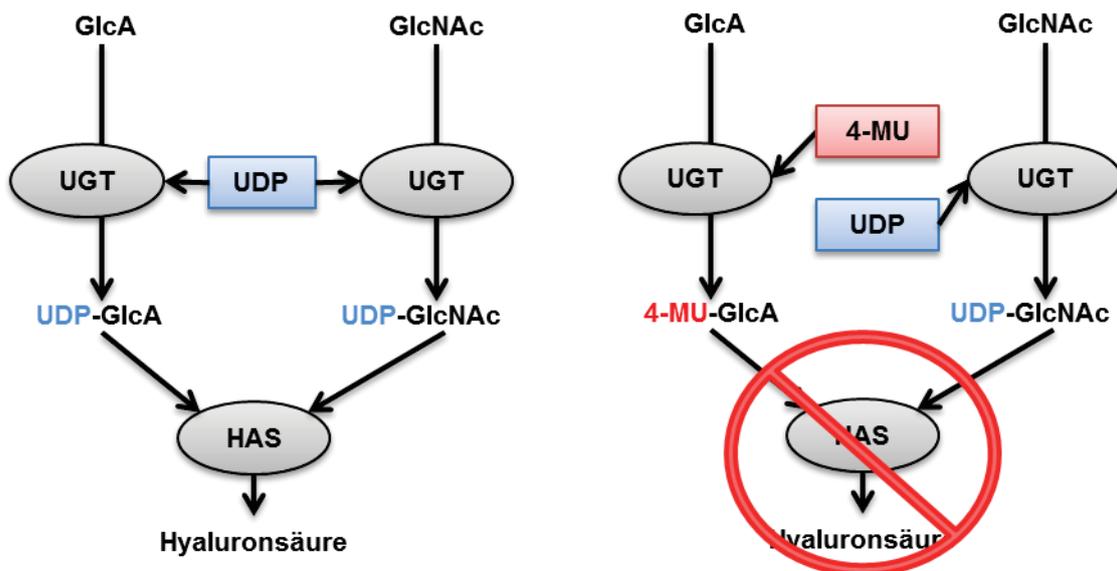


Abbildung 8: 4-Methylumbelliferon (4-MU) inhibiert die Hyaluronsäure-Synthese. 4-MU als kompetitives Substrat wird anstelle eines Uridindiphosphat (UDP) durch die UDP-Glukuronosyltransferase (UGT) mit D-Glukuronsäure (GlcA) verknüpft. Durch Substratverarmung wird die Hyaluronsäure-Synthase (HAS) gehemmt. Das Substrat N-Acetyl-D-Glukosamin (GlcNAc) ist nicht von der 4-MU-vermittelten Hemmung betroffen. Abbildung modifiziert nach [90].

Einleitung

Zusätzlich wurden noch weitere transkriptionale und posttranskriptionale Wirkmechanismen von 4-MU auf HA postuliert. So wurde bei Zellkulturexperimenten gezeigt, dass 4-MU eine erniedrigte Transkription von HAS2 und HAS3 erzeugt [89]. Ebenso wurde in einer weiteren Studie beschrieben, dass die Genexpression der UDP-Glukose-Pyrophosphorylase (UGPP) sowie der UDP-Glukose-Dehydrogenase (UGDH) reduziert vorlagen. Diese beiden Enzyme sind maßgeblich an der Produktion der HA-Vorstufen beteiligt [91]. Zudem wurde auch von einer reduzierten Genexpression der HA-Rezeptoren, CD44 und RHAMM, nach 4-MU-Behandlung berichtet. 4-MU übt also demnach nicht nur eine inhibitorische Wirkung auf die HA-Synthese aus sondern auch auf die HA-Signaltransduktion [92].

Posttranskriptional wurde weiterhin eine reduzierte Phosphorylierung der HAS2 nach 4-MU-Behandlung beschrieben, die mit einer erniedrigten HAS-Aktivität und HA-Synthese einherging [93]. Schließlich zeigten Rilla *et al.*, dass durch 4-MU-Behandlung die Assoziation der HAS3 mit der Plasmamembran verhindert wird [94].

In dieser und anderen Studien wurde die Rolle von 4-MU in verschiedenen Zell- und Tiermodellen im Kontext der Tumorbilogie untersucht. Dabei wurde übereinstimmend gezeigt, dass 4-MU die Proliferation, Migration und Invasion von Tumorzellen bremst oder sogar verhindert. Zusätzlich wurde auch von einer Wachstumshemmung sowie einer erhöhten Apoptose in entarteten Zellen nach 4-MU-Behandlung berichtet. Eine anti-angiogene und anti-inflammatorische Wirkung von 4-MU wurde auch festgestellt. Ob die beobachteten Effekte tatsächlich über eine alleinige Hemmung der HA-Synthese zu begründen sind, blieb unklar. [90].

Durch den langjährigen klinischen Einsatz als Gallentherapeutikum wird 4-MU in der Fachliteratur als sichere Substanz für die Anwendung *in vivo* bewertet und gilt als robuster sowie zuverlässiger Hemmer der HA-Synthese.

1.3 Zielsetzung

Das myokardiale *Remodeling* im Rahmen von Herz-Kreislaufkrankungen, wie etwa beim arteriellen Hypertonus oder bei der HCM, kann die Pumpfunktion des Herzens verschlechtern und zu Herzrhythmusstörungen sowie den plötzlichen Herztod führen. Kompliziert werden die myokardialen Umbauprozesse zudem dadurch, dass sie durch konventionelle Therapie nicht umkehrbar sind und die Ursachen oft nicht zu beseitigen sind. Daher ist der Bedarf neuer Strategien zur Prävention (und Therapie) des myokardialen *Remodeling* unverändert hoch.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Rolle der HA im myokardialen *Remodeling* bei der Entwicklung kardialer Hypertrophie zu charakterisieren.

Im Rahmen einer Vorstudie wurde im ersten Teil der Arbeit eine Transkriptom- sowie Proteomanalyse durchgeführt mit dem Ziel Schlüsselgene und -proteine für die Pathogenese der HCM zu identifizieren. Diese Untersuchungen zeigten übereinstimmend im genetischen Hypertrophie-Modell eine signifikante Dysregulation von Genen und Proteinen der EZM. Dieser Befund sowie die Kenntnis der HA als zentrale Komponente der EZM und Schlüsselmolekül in der Pathogenese anderer Herzerkrankungen wie Atherosklerose und Myokardinfarkt führte zu der Hypothese, dass die HA eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von myokardialer Hypertrophie ausüben könnte.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Bedeutung der HA für die Hypertrophie-Entwicklung zunächst in einem *in vitro*-Zellmodell an kultivierten Myoblasten untersucht und validiert. Nach pharmakologischer Hypertrophie-Stimulation wurde der Einfluss von 4-MU auf die Zellgröße analysiert.

Schließlich war das Ziel im dritten Teil der Arbeit die Rolle der HA in einem *in vivo*-Mausmodell nach operativer Aortenstenosierung zu charakterisieren durch den Vergleich von Tieren mit und ohne 4-MU-Behandlung. Es erfolgte eine umfangreiche histochemische und molekularbiologische Untersuchung der Herzen zur Phänotypisierung des *Remodeling* der Myozyten und der EZM. Darüber hinaus wurde eine echokardiografische Messung zur Analyse der Herzfunktion durchgeführt und der Inflammationsstatus durchflusszytometrisch analysiert.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Feinchemikalien, Medien, Lösungen und *Kits*

Tabelle 1: Liste der verwendeten Feinchemikalien, Medien, Lösungen und *Kits*. Nach alphabetischer Reihenfolge sortiert.

Produkt	Hersteller
4-MU	Alfa Aesar, Haverhill, MS, USA
Alexa Fluor® 488-Phalloidin	Molecular Probes, Life Technologies, Paisley, UK
Alexa Fluor® 488-WGA	Molecular Probes, Life Technologies, Paisley, UK
Aquasonic 100 Gel	Parker Laboratories, Fairfield, NJ, USA
Avidin-Biotin Blockiersystems	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
BSA	Merck Millipore, Burlington, MS, USA
Celestine-Blau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Custadiol®	Köhler Chemie GmbH, Bensheim, D
DAB	Zytomed, Berlin, D
DMEM, <i>high glucose</i>	Gibco, Life Technologies, Paisley, UK
DNase (für RNA-Isolation)	Qiagen, Hilden, D
DNase I (für Isolation von Kardiomyozyten)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EDTA-haltige Trypsinlösung	Gibco, Life Technologies, Paisley, UK
Enthaarungscreme	Veet, Reckitt Benckiser, Berkshire, UK
FCS	Gibco, Life Technologies, Paisley, UK
Flow-Count Fluorospheres	Beckman Coulter Inc., Krefeld, D
HABP Sandwich ELISA-ähnliches Kit	Corgenix, Broomfield, CO, USA
Haltungsfutter	ssniff-Spezialdiäten, Soest, D
Hämalaun	Merck Millipore, Burlington, MS, USA
HBSS	Gibco, Life Technologies, Paisley, UK
HotMaster Taq DNA Polymerase	QuantaBio, Beverly, MA, USA
HRP-Streptavidin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Immobilon®-P PVDF Membran	Merck Millipore, Burlington, MS, USA

Material und Methoden

Isoprenalin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kollagenase I	Worthington, Lakewood, NJ, USA
LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Luminata Forte	Merck Millipore, Burlington, MS, USA
Parafilm	Laboratory Film, Chicago, IL, USA
PBS	Gibco, Life Technologies, Paisley, UK
Penicillin-Streptomycin	Gibco, Life Technologies, Paisley, UK
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Proteinase K	Qiagen, Hilden, D
RNase	Roche, Mannheim, D
RNase ZAP™	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RNeasy® Mini / Midi Kit	Qiagen, Hilden, D
Roti®-Mount FluorCARE DAPI	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D
Roticlear®	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D
RPMI 1640	Gibco, Life Technologies, Paisley, UK
Sirius-Rot	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Super RX-N Röntgenfilm	Fujifilm, Tokio, JP
Superscript II™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SYBR®-Green	Lonza, Basel, Schweiz
Trypanblau	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Vectashield® H-1000	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

Nicht aufgeführte Materialien wurden von einem der folgenden Herstellern bzw. Händlern bezogen: Life Technologies, Merck, Sigma-Aldrich, VWR oder Roth.

Verwendete Geräte sowie Software sind an den entsprechenden Stellen im Methodenteil (2.2) vermerkt.

2.1.2 Antikörper

Tabelle 2: Liste der verwendeten Antikörper für *Western Blot*, immunhistochemische Färbungen und Durchflusszytometrie.

Antikörper / Hersteller	Wirt	mono- / polyklonal	Verdünnung	Katalognr.
Erstantikörper				
anti-pERK1/2 Cell Signaling Technology (Boston, MA, USA)	Hase	polyklonal	1:1000	#9101
anti-ERK1/2 Cell Signaling Technology (Boston, MA, USA)	Hase	polyklonal	1:1000	#9102
anti-Mac-2 (M3/38) Cedarlane (Burlington, CAN)	Ratte	monoklonal	1:1000	CL8942AP
Zweitantikörper				
anti-rabbit (IgG-HRP) Rockland (Limerick, PA, USA)	Ziege	polyklonal	1:10.000	611-1302
anti-rat (IgG2a-HRP) Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)	Ziege	polyklonal	1:500	NB7126
Antikörper für die Durchflusszytometrie				
anti-Ly6C-APC (HK1.4) Biolegend (San Diego, CA, USA)	Ratte	monoklonal	1:8	128015
anti-F4/80-PE (BM8) Biolegend (San Diego, CA, USA)	Ratte	monoklonal	1:8	123109
anti-CD45-AF700 (30-F11) Biolegend (San Diego, CA, USA)	Ratte	monoklonal	1:8	103127
anti-CD11b-PE/Dazzle594 (M1/70) Biolegend (San Diego, CA, USA)	Ratte	monoklonal	1:8	101255
anti-CD11c-APC (N418) Biolegend (San Diego, CA, USA)	Hamster	monoklonal	1:8	117309
anti-Ly6G-PacificBlue (1A8) Biolegend (San Diego, CA, USA)	Ratte	monoklonal	1:8	127611
anti-CCR2-FITC (475301) R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)	Ratte	monoklonal	1:8	FAB5538P
anti-I-A ^b -PE/Cy7 (AF6-120.1) Biolegend (San Diego, CA, USA)	Maus	monoklonal	1:8	116419
anti-CD16/32 (93) Biolegend (San Diego, CA, USA)	Ratte	monoklonal	1:1	101301

2.1.3 Biologisches Material

2.1.3.1 Zelllinie

Die Kardiomyoblasten-Zelllinie H9C2 (Lot 17A028) wurde bei *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC, Porton, UK) erworben [29].

2.1.3.2 Mäuse

Tabelle 3: Liste der verwendeten Mausstämme.

Mausstamm	Genotyp	Herkunft
SvEv129	WT & VM/RC	Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf, D
C57BL/6J	WT	Janvier, Le Genest Saint Isle, F

2.2 Methoden

2.2.1 Zellversuche

Als *in vitro*-Hypertrophie-Modell wurde die H9C2-Zelllinie [29] verwendet, die ursprünglich aus dem Ventrikel von BD1X-Rattenembryos isoliert wurde.

Nach Stimulation mit Isoprenalin ist eine Vergrößerung der Zellgröße und eine verstärkte Genexpression der klassischen Hypertrophie-Marker ANP und BNP zu beobachten. Eine ausführliche Beschreibung ist im Abschnitt 1.1.3.1 zu finden. Die H9C2-Zellen gelten in der Herzforschung als etabliertes Modell zur Untersuchung von kardialer Hypertrophie [30].

2.2.1.1 Kultivierung von H9C2-Kardiomyoblasten

Die Erhaltungskultur für die H9C2-Zellen (Lot 17A028) erfolgte in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), dem 10 %-iges fetales Kälberserum (englisch: *fetal calf serum*, FCS) und eine 1 %-ige Penicillin-Streptomycin-Lösung zugesetzt war, im Brutschrank bei 37°C sowie einer Kohlenstoffdioxidzufuhr von 5 %. Die Zellen wurden 2-3 wöchentlich passagiert bevor sie eine Konfluenz von maximal 70 % erreichten. Zum Passagieren wurden die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (englisch: *phosphate-buffered saline*, PBS) gewaschen und durch Zugabe einer EDTA-haltigen Trypsinlösung von der Zellkulturschale gelöst. Nachdem die Zellzahl durch Trypanblau-Färbung bestimmt worden war, wurden sie in einem Verhältnis von 1:3 - 1:10 auf einer T-75-Zellkulturflasche ausgesät. Die Zellen wurden für die Experimente nicht öfter als 10-mal passagiert.

2.2.1.2 Isoprenalin-Stimulation und 4-MU-Behandlung

Um den Einfluss einer 4-MU-Behandlung in Isoprenalin-stimulierten H9C2-Kardiomyoblasten zu untersuchen, wurden 5000 Zellen pro *well* einer 12-*well*-Platte in Vollmedium ausgesät. Für die mikroskopische Analyse wurden die *wells* zuvor mit autoklavierten Deckgläschen eines Durchmessers von 18 mm bestückt. Nach 24 Stunden wurde das Vollmedium durch serum-freies Medium ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen mit einer 100 µM 4-MU-Natriumsalzlösung in Vollmedium behandelt. Die 100 µM Isoprenalin-Lösung wurde bei den doppelbehandelten Zellen erst nach 30 min hinzugegeben. Die Zellen wurden nach 24 Stunden entweder einer zytochemischen Phalloidin-Färbung unterzogen (2.2.3.1.1) oder wurden für eine Bestimmung der sekretierten HA-Menge mittels eines ELISA-ähnlichem Assay (2.2.5.1) verwendet. Für jedes Experiment wurden zur Kontrolle Zellen ohne Behandlung sowie nach einfacher Behandlung mit Isoprenalin oder 4-MU mitgeführt.

2.2.2 Tierversuche

Die Tierversuche wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen unter dem Aktenzeichen Az. 84-02.04.2013.A122 genehmigt und wurden gemäß dem Deutschen Tierschutzgesetz nach §8 durchgeführt. Die Zucht und Haltung der Mäuse sowie die Durchführung der Versuche fand unter standardisierten Bedingungen in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf statt. Die Tiere wurden in einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten.

2.2.2.1 Verwendete Tiere sowie Behandlung, Organentnahme und Probenaufbereitung

Um die Rolle der HA in der Pathogenese der Myokardhypertrophie *in vivo* zu studieren, wurden zwei verschiedene Mausstämme sowie unterschiedliche Behandlungsschemata herangezogen. Für die Vorstudie wurden Tiere des Mausstamms 129/SvEv verwendet und für die Hauptstudie Mäuse des Stamms C57BL/6J. Die Tiere innerhalb beider Studien waren alters- als auch geschlechtsadaptiert, sodass eine höchstmögliche Vergleichbarkeit gewährleistet war. Die Tiere wurden durch zervikale Dyslokation getötet. In den nachfolgenden Abschnitten wird das weitere Verfahren hinsichtlich Behandlung, Organentnahme und Probenaufbereitung für die jeweiligen Gruppen erläutert.

Für die Transkriptom- (3.1.1) und Proteom-Analysen (3.1.2) wurden männliche VM/RC-Mäuse gegen geschlechts- und altersadaptierte WT-Mäuse des Mausstamms 129/SvEv verglichen. Zum Zeitpunkt der Organentnahme waren die Mäuse beider Gruppen zwischen 6 und 8 Wochen alt. Eine ausführliche Beschreibung ist dem Abschnitt 1.1.3.2 zu entnehmen. Nach Tötung wurde der Thorax mittels Längsschnitt eröffnet und die Herzventrikel herauspräpariert. Das Herzgewebe wurde kurz in einer Petrischale mit 0,7% Natriumchlorid (NaCl) (w/v) gespült und unverzüglich in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die weitere Verwahrung erfolgte bei -80°C.

Zur Bestimmung der basalen *Has*-Hauptisoform im Herzen und zur Untersuchung der zeitabhängigen Genexpression der *Has*-Isoformen 3 Tage nach TAC-OP- bzw. nach Schein-Operation (-OP) im Herzgewebe (3.1.5.1) wurden 8 Wochen alte männliche C57BL/6J Mäuse von Janvier (Le Genest Saint Isle, F) verwendet. Die Organentnahme erfolgte wie zuvor beschrieben.

Die Experimente zur Untersuchung einer verminderten HA-Synthese mittels 4-MU (3.3) wurden ebenfalls in männlichen Mäusen des Stamms C57BL/6J durchgeführt, die zuvor bei Janvier (Le Genest Saint Isle, F) erworben wurden. Ab einem Alter von 16 Wochen wurde eine Gruppe von Mäusen fortlaufend mit 4-MU behandelt. Dafür wurden 50 g/kg 4-MU in

Material und Methoden

normales Mäuse-Haltungsfutter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, D) eingearbeitet. Zudem wurde das Futter beider Gruppen, also der Kontroll- sowie der 4-MU-Gruppe, zusätzlich mit Schokoladen-Aroma versetzt um eine schnellere Akzeptanz bei der Futterumstellung zu erzielen. Eine vollständige Zusammenstellung der Inhaltsstoffe ist dem Appendix zu entnehmen (Tabelle 12). Ab Fütterungsbeginn wurde täglich das Körpergewicht, sowie die durchschnittlich aufgenommene Futtermenge dokumentiert, mit dem Ziel einer körperlsgewichts-adaptierten Fütterung. Somit wurde die Futtermenge für die Kontrollgruppe angepasst, während die 4-MU-behandelten Mäuse *ad libitum* gefüttert wurden. Sieben bis 10 Tage nach Beginn der 4-MU-Behandlung wurden die Mäuse beider Gruppen einer operativen Stenosierung des Aortenbogens unterzogen. Es wurden zwei Nachuntersuchungszeiträume betrachtet, und zwar 3 Tage nach TAC-OP sowie eine Langzeit-Studie 7 Wochen nach TAC-OP. Für die Kurzzeitstudie wurden zusätzlich scheinoperierte (englisch: *sham*) Mäuse als Kontrolle betrachtet. Für die Langzeit-Studie wurden die Mäuse 1 Tag vor, sowie 2 und 7 Wochen nach TAC-OP einer Echokardiografie unterzogen. Die Mäuse wurden am Ende des Experiments einen Tag nach der letzten echokardiografischen Untersuchung durch zervikale Dyslokation getötet (Abbildung 9).

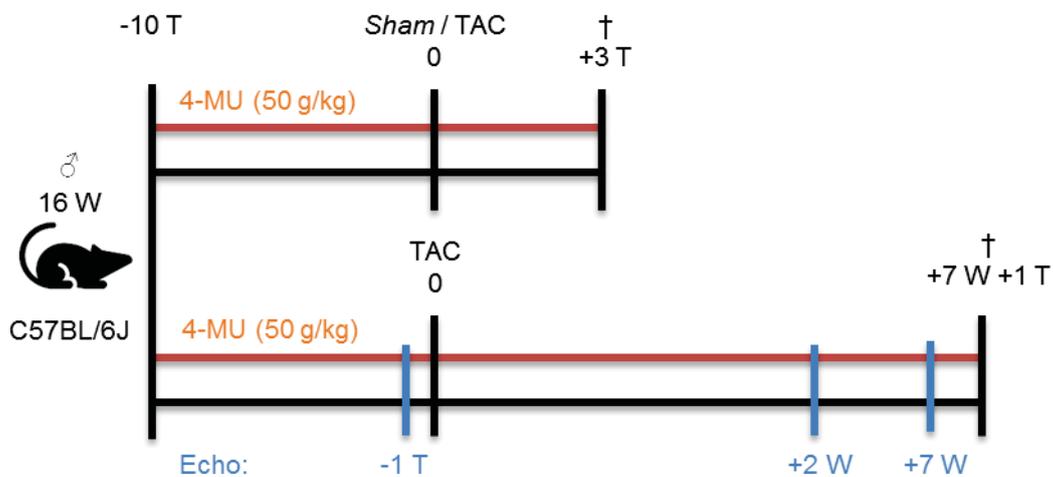


Abbildung 9: Studiendesign nach 4-Methylumbelliferon (4-MU)-Behandlung. Männliche C57BL/6J Mäuse wurden ab einem Alter von 16 Wochen mit 4-MU (50g/kg) oder einer Kontrolldiät behandelt. Nach einer 10-tägigen Behandlungsdauer wurden alle Tiere einer operativen Stenosierung des Aortenbogens (TAC)- oder einer Schein (*Sham*)-Operation unterzogen. Es wurden zwei Nachuntersuchungszeiträume betrachtet, 3 Tage sowie 7 Wochen nach TAC- bzw. *Sham*-OP. Für die Langzeit-Studie wurden zudem 1 Tag vor, sowie 2 und 7 Wochen nach TAC-OP echokardiografische Untersuchungen (Echo) durchgeführt.

Das Körpergewicht wurde kurz vor der Euthanasierung dokumentiert. Nach Genickbruch wurde der Thorax eröffnet und das Herz freipräpariert. Für die histologische Bestimmung der Kardiomyozytengröße mittels *Wheat Germ Agglutinin* (WGA)-Färbung (2.2.3) ist es wichtig, dass die Herzen während der Relaxationsphase fixiert werden. Daher wurde das Herz mit kardiopleger Lösung nach Bretschneider (Custodiol®) perfundiert. Die natrium- und kalzium-

Material und Methoden

arme Lösung bewirkt einen Herzstillstand während der Diastole. Nach Eröffnung des rechten Vorhofs wurde die Spitze des linken Ventrikels mit einer Kanüle punktiert und das Herzgewebe durch Höhendruck (100 cm) unter physiologischem Druck mit ca. 5 mL Custadiol® perfundiert. Sobald kein Herzschlag mehr zu beobachten war, wurde das Herz entnommen und kurz in einer Petrischale mit 0,7% NaCl (w/v) gespült. Zum Entfernen überschüssiger Feuchtigkeit aus den Herzkammern wurde das Herz kurz mit der Basis auf einem Papiertuch gelegt. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Feuchtgewichts. Die Vorhöfe wurden abgetrennt und die Ventrikel des Herzens wurden in transverser Schnitfführung in drei Teile geschnitten. Die Herzbasis wurde für die histologischen Untersuchungen zunächst über Nacht bei 4°C in einer 4 %-igen Formaldehydlösung (v/v) fixiert und bis zur weiteren histologischen Aufarbeitung (2.2.3) bei 4°C in PBS aufbewahrt. Das mittlere Stück wurde für Genexpressionsanalysen (2.2.4) verwendet und zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt. Mit dem apikalen Teil wurde der Wassergehalt des Herzgewebes ermittelt. Dafür wurde das Feuchtgewicht des Gewebestücks nach Entnahme bestimmt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach einer Gefriertrocknung (ALPHA 2-4 LSC, Christ, Osterode am Harz, D) mit angeschlossener Vakuumpumpe (RC6, Vacuubrand, Wertheim, D) wurde das Trockengewicht gemessen. Als letztes wurde die Tibia-Länge am isolierten rechten Unterschenkel als Parameter für die Körpergröße bestimmt.

Für die durchflusszytometrische Analyse (3.3.8) wurden wieder 16 Wochen alte männliche C57BL/6J Mäuse untersucht. Die 4-MU-Behandlung erfolgte gemäß dem zuvor beschriebenen Versuchsablauf. Es wurden die Zeitpunkte kurz vor und 3 Tage nach TAC-OP betrachtet (Abbildung 10). Die Blutentnahme am Tag 0, also am Tag der OP, erfolgte durch Kappen der Schwanzspitze. Nach der Tötung wurde das Blut durch eine Herzpunktion entnommen.

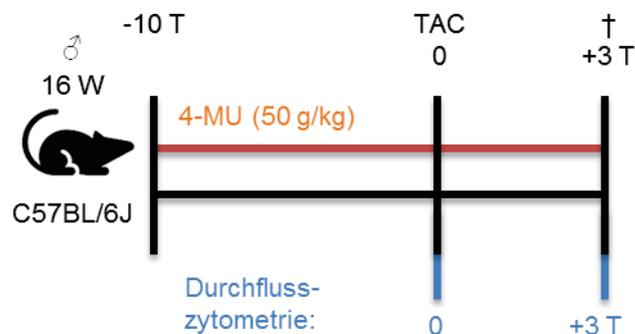


Abbildung 10: Studiendesign nach 4-Methylumbelliferon (4-MU)-Behandlung für durchflusszytometrische Analyse. Männliche C57BL/6J Mäuse wurden ab einem Alter von 16 Wochen mit 4-MU (50g/kg) oder einer Kontrolldiät behandelt. Nach einer 10-tägigen Behandlungsdauer wurden alle Tiere einer operativen Stenosierung des Aortenbogens (TAC) unterzogen. Kurz vor TAC- sowie 3 Tage nach TAC-Operation wurde Blut (Tag 0) bzw. Blut und Herz (Tag 3) für eine durchflusszytometrische Analyse der enthaltenen Immunzellen entnommen.

Material und Methoden

Unmittelbar danach wurde das Herz für 20 min mit einer Kollagenase I- (450 U/ml) und DNase I-Lösung (60 U/ml) in gepufferter Salzlösung, *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS), retrograd perfundiert. Anschließend wurde das Herzgewebe zerkleinert und für weitere 15 min in der Lösung inkubiert. Die Zellsuspension wurde daraufhin nacheinander durch Nylonetze mit einer Porengröße von 100 µm und 40 µm gegeben und bei 300 g für 10 min zentrifugiert. Das sedimentierte Zellpellet wurde im Zellkulturmedium RPMI 1640 resuspendiert und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Schließlich wurde die Einzelzellsuspension für die Durchflusszytometrie mit entsprechenden Antikörpern gefärbt und analysiert (2.2.5.4).

2.2.2.2 Operative Stenosierung des Aortenbogens und Schein-Operation

Die TAC ist ein etabliertes Modell zur Erforschung von Herzinsuffizienz, die durch eine Einengung der *Aorta transversa* erzeugt wird und aufgrund einer Erhöhung der linksventrikulären Nachlast eine Hypertrophie des Herzens induziert.

Zu Beginn der OP wurde die Narkose durch intraperitoneale Applikation von Pentobarbital (50 mg/kg Körpergewicht) eingeleitet. Anschließend wurden die Mäuse nach Intubation an ein Beatmungsgerät (Minivent, Harvard, Holliston, MA, USA) angeschlossen und auf einem beheizbaren Operationsplatz positioniert. Durch eine linksseitige Thorakotomie wurde unter einem Stereomikroskop (M50, Leica, Wetzlar, D) der Aortenbogen dargestellt. Eine Stenose definierter Größe wurde durch Anlegen einer 27 G Nadel an die Aorta sichergestellt. Unmittelbar nachdem die Nadel und Aorta zwischen dem Abgang des *Truncus brachiocephalicus* und der *Arteria carotis sinistra* mit einem 7.0 Seidenfaden umschlungen und verknotet war, wurde die Nadel entfernt (Abbildung 3). Somit wurde ein einheitlicher Stenosegrad erzeugt. Der Wundverschluss wurde mit resorbierbarem Nahtmaterial durchgeführt und nach Eintreten der Spontanatmung erfolgte die Extubation. Die Maus verweilte bis zum vollständigen Erwachen auf einer 37°C erwärmten Heizplatte. Die perioperative Analgesie erfolgte durch subkutane Injektion von Buprenorphine (0.05–0.1 mg/kg Körpergewicht, dreimal täglich).

Die *sham*-Operation wurde in gleicher Weise ausgeführt mit der Ausnahme, dass nach Umschlingen der Aorta der Knoten im Seidenfaden nicht festgezogen wurde.

Die operativen Eingriffe wurden von Prof. *Dr. med.* J. P. Schmitt (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, D) durchgeführt.

2.2.2.3 Echokardiografie

Eine echokardiografische Untersuchung wurde zur linksventrikulären Funktionsanalyse des Herzens für die Langzeit-Studie (3.3.5) herangezogen. Hierfür wurde die Pumpfunktion des Herzens basal 1 Tag vor TAC-OP und postoperativ, nämlich 2 und 7 Wochen nach TAC-OP, analysiert und unter 4-MU-Behandlung zur Kontrollgruppe verglichen.

Die Einleitung der Narkose erfolgte in einer Narkosekammer mit 2,5 % (v/v) Isofluran in Sauerstoff. Bei ausreichender Narkosetiefe wurden die Mäuse mithilfe einer Atemmaske für Kleinnager mit 2 % (V/V) Isofluran in Sauerstoff beatmet, sodass die Narkose aufrechterhalten wurde. Die Schallfenster wurden mittels Enthaarungscreme von Haaren befreit. Anschließend wurden die Tiere auf einem 37°C-beheizten Elektroden-Kontakt-Block fixiert, um einem Auskühlen der Körpertemperatur während der Narkose entgegenzuwirken. Die Überwachung der Vitalparameter wurde durch ein Elektrokardiogramm und der Messung von Körpertemperatur und Atem- sowie Herzfrequenz sichergestellt. Vorgewärmtes Aquasonic 100 Gel diente als Ultraschallkontaktgel und wurde auf dem enthaarten Brustkorb aufgetragen. Die echokardiografischen Untersuchungen wurden unter Verwendung des hochauflösenden Ultraschallgeräts Visual Sonic Vevo 3100 (VisualSonics Inc., Toronto, Canada) und einem 30-MHz Schallkopf (VisualSonics Inc., Toronto, Canada) durchgeführt.

Zur Ermittlung der parasternalen kurzen und langen Achsen wurde im B- und im M-Mode der linke Ventrikel vermessen. Mit diesen Werten ist es möglich, die Hinterwanddicke (englisch: *posterior wall thickness*, PWT) und die interventrikuläre Wandstärke (IVS) sowie die linksventrikulären endsystolischen und enddiastolischen inneren Durchmesser (LVIDs und LVIDd) zu bestimmen. Weiterhin können damit weitere Parameter, wie etwa die Verkürzungsfraction (englisch: *fractional shortening*, FS), das linksventrikuläre endsystolische und enddiastolische Volumen (ESV und EDV), die Ejektionsfraction (EF), das Schlagvolumen (SV) sowie das Herzzeitvolumen (HZV) und die berechnete Herzmuskelmasse des linken Ventrikels (englisch: *calculated LV mass*) abgeleitet werden.

Zusätzlich wurde postoperativ die Flussgeschwindigkeit des Blutes an der Stenose im Aortenbogen mittels Doppler-Echokardiografie bestimmt, sodass der Stenosegrad nach TAC-OP gemäß dem Gesetz von Bernoulli berechnet wurde ($\text{Gradient} = 4 \times \text{Flussgeschwindigkeit}^2$).

Die Daten stellen ein arithmetisches Mittel aus mindestens 4 Herzzyklen pro Maus dar. Nach der Messung wurde die Maus bis zum vollständigen Erwachen überwacht.

Prof. Dr. med. J. P. Schmitt, (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, D), hat die hier beschriebenen Arbeiten durchgeführt. Die Untersuchung sowie die Auswertung erfolgten verblindet.

2.2.3 Histologie und Zytologie

2.2.3.1 Zytochemische Färbungen

Die zytochemischen Färbungen bezeichnen Färbungen von Einzelzellen, die vorwiegend in *in vitro*-Experimenten der Zellkultur zum Einsatz kommen.

2.2.3.1.1 Phalloidin

Die zuvor auf Deckgläschen ausgesäen und behandelten H9C2-Zellen (2.2.1.2) wurden zunächst mit 37°C warmen PBS zweimal gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer 3,7 %-igen Formaledehyd-PBS-Lösung (v/v) für 10 min fixiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS wurden die Zellen mit einem Detergenz, 0,1 %-iger Triton X-100-PBS-Lösung (v/v), auf Eis für 3 min permeabilisiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und für 30 min in einer Blockierlösung, bestehend aus 1 %-igen bovines Serumalbumin (BSA) in PBS (w/v), inkubiert. Die Alexa Fluor 488®-Phalloidin-Lösung wurde 1:500 in der Blockierlösung verdünnt und für 20 min im Dunkeln inkubiert. Nach zwei Waschschritten in PBS wurde die Kernfärbung mit Roti®-Mount FluorCARE DAPI durchgeführt und die Einbettung erfolgte mit Vectashield® H-1000 zum Schutz vor Ausbleichen der Fluoreszenzsignale.

Die Bildaufnahmen am AxioImager.A2 Mikroskop und der ZEN Software 2.3 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D) wurden innerhalb einer Woche durchgeführt, bis dahin war eine lichtgeschützte Aufbewahrung der Objektträger notwendig. Die Zellen wurden mit 20-30 Bildaufnahmen pro Versuchsbedingung bei 40-facher Vergrößerung im blauen (465 nm) und grünen Kanal (517 nm) aufgenommen. Mit dem Programm Image J 1.48 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) wurden die Bilder über ein Makro in ein Schwarzweiß-Bild konvertiert und schließlich wurden manuell 50 Zellen pro Versuchsbedingung ausgewählt. Auswahlkriterium war das Vorliegen einer abgrenzbaren Zelle ohne Kontakt zu Nachbarzellen mit einem einzelnen Zellkern. Pro Versuchsbedingung wurde somit das arithmetische Mittel aus 50 Zellgrößen gebildet.

2.2.3.2 Histochemische Färbungen

Zur Beurteilung morphologischer Veränderungen des Herzens wurden sowohl histochemische als auch immunhistochemische Färbungen von Paraffingewebsschnitten herangezogen. In den folgenden Abschnitten werden die Herstellung von Paraffinschnitten (2.2.3.2.1) und die verschiedenen angewandten Färbetechniken beschrieben (2.2.3.2.2 - 2.2.3.2.5).

2.2.3.2.1 Paraffinschnitte von Myokardbiopsien

Die fixierten Myokardbiopsien wurden bis zur weiteren Aufarbeitung in Histosetten® gelegt und in PBS bei 4°C verwahrt. Die anschließende Entwässerung erfolgte maschinell im Autotechnikon (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) und die Einbettung in Paraffin manuell an einer Gießstation (Leica Microsystems, Wetzlar, D). Unter Verwendung des Rotationsmikrotoms RM 2255 (Leica Microsystems, Wetzlar, D) wurden 5 µm dicke Gewebsschnitte angefertigt, die zum Strecken in ein 40°C warmes Wasserbad überführt wurden. Nachdem die Gewebsschnitte auf einem Objektträger aufgezogen und bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet wurden, erfolgte die Hitze-fixierung für eine Stunde bei 60°C in einem Wärmeschrank.

Die Gewebsschnitte wurden vor Beginn jeder Färbung entparaffinisiert. Dazu wurden sie dreimal für jeweils 15 min in dem Lösungsmittel Roticlear® eingelegt und für jeweils 2 min mit einer absteigenden Ethanolreihe (100 %; 96 %; 70 %) gewässert und zweimal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen.

Zu Konservierungszwecken wurden die Schnitte nach erfolgter Färbung mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %; 96 %; 100 %) für jeweils 2 min entwässert, für 5 min in Roticlear® eingelegt und mit dem Eindeckmedium Roti®-Mount eingedeckt.

2.2.3.2.2 Hyaluronsäure

Die HA eignet sich aufgrund seiner chemischen Struktur nicht als Zielstruktur für einen direkten Nachweis mittels Antikörper. Um dennoch eine Veränderung in der HA-Synthese auf Produktebene zu bestimmen, erfolgte eine histochemische Färbung mittels des Hyaluronsäure-Bindeproteins (HABP), das spezifisch und stark an HA bindet.

Nach erfolgter Entparaffinisierung und Rehydrierung wurden endogene Biotin-Strukturen mittels eines Avidin-Biotin Blockiersystems entsprechend den Herstellerangaben neutralisiert. Nach einer einstündigen Inkubation mit Blockierlösung (10 % 10x TBS (v/v), 10 % FCS (v/v), 1 % BSA (w/v)), wurden die Gewebsschnitte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer mit biotinyliertem HABP (1:100) in 1%-iger BSA-PBS-Lösung behandelt.

Material und Methoden

Am nächsten Tag wurden die Schnitte nach drei 5-minütigen PBS Waschschritten mit 3%-igem Wasserstoffperoxid (in PBS verdünnt) zur Inaktivierung von Peroxidasen für 5 min gebleicht und dreimal mit PBS gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit Streptavidin-konjugierter Meerrettichperoxidase (englisch: *horseradish peroxidase*, HRP) (1:200) in einer feuchten Kammer und drei Waschschritten mit PBS. Zur Detektion wurde eine Behandlung mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt, das als chromogenes Substrat für die HRP diente. Vor dem Entwässern und Eindecken wurde noch eine Kernfärbung mit Hämalaun durchgeführt.

Für die Auswertung wurden im linken Ventrikel sechs Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung mit dem Axiomager.A2 Mikroskop und der ZEN Software 2.3 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D) getätigt.

Zur Quantifizierung wurde das Programm Image J 1.48 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) herangezogen, das zusätzlich über das *Color Deconvolution Plugin* verfügte [95]. Dieses ermöglichte eine Aufspaltung des Bildes in den roten Farbkanal, sodass unter Verwendung eines konstanten Schwellenwerts die spezifische Braunfärbung vom Hintergrundsignal abgegrenzt und quantifiziert wurde. Der prozentuale Anteil der Braunfärbung wurde auf die im Bild dargestellte Gewebsfläche normalisiert und folglich wurde daraus ein arithmetisches Mittel der sechs Bildaufnahmen gebildet.

2.2.3.2.3 Makrophageninfiltration

Während eines akuten Entzündungsstimulus wird zunächst das angeborene Immunsystem aktiviert. Diese Phase ist unter anderem durch Infiltration von Makrophagen gekennzeichnet, die von anderen Zyto- und Chemokinen angelockt und rekrutiert wurden. Als immunhistologischer Marker gilt Mac-2, auch als Galectin-3 bekannt, in Forschungskreisen als etabliert. Mac-2 ist ein Oberflächenprotein, welches als spezifischer Marker von Makrophagen beschrieben ist [96].

Die Arbeitsschritte für das Färbeprotokoll waren entsprechend dem Protokoll zur Detektion der Hyaluronsäure (2.2.3.2.2) mit wenigen Abweichungen. Ein Blockieren der endogenen Biotin-Strukturen mittels eines Avidin-Biotin Blockiersystems war in diesem Fall nicht notwendig, da der Erstantikörper anti-Mac-2 (1:1000) nicht biotinyliert war. Anstatt der Streptavidin-konjugierten HRP wurde ein Zweitantikörper, anti-IgG2A-HRP, in einer Konzentration von 1:500 verwendet.

Der linke Ventrikel wurde über eine zusammengesetzte Aufnahme in 10-facher Vergrößerung Axiomager.A2 Mikroskop und der ZEN Software 2.3 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D) dargestellt. Färbeartefakte, wie zum Beispiel Auffaltungen des Schnittes oder Randartefakte, wurden von der Auswertung mit dem Programm Image J 1.48 (National

Material und Methoden

Institutes of health, Bethesda, MD, USA) ausgeschlossen. Die Auswertung erfolgte ansonsten wie zuvor beschrieben (2.2.3.2.2) mithilfe des *Color Deconvolution Plugin* [95]. Der prozentuale Anteil der Braunfärbung wurde auf die betrachtete Gewebefläche des linken Ventrikels normalisiert.

2.2.3.2.4 Fibrose

Fibrose ist durch Vermehrung von Bindegewebszellen und Kollagenfasern charakterisiert. Letztere werden durch den Farbstoff Picro-Sirius-Rot spezifisch angefärbt und ermöglichen somit eine Abschätzung des Fibrose-Ausmaßes im Herzen.

Nach der Entparaffinisierung und Rehydrierung wurden die Gewebsschnitte für eine Minute mit destilliertem Wasser gewaschen und für 7 min in einer Celestine-Blau-Lösung zur Zellkernfärbung behandelt. Danach wurden die Schnitte zweimal in einer 1%-igen Salzsäure (HCl) differenziert und 5 min lang unter laufendem Leitungswasser gebläut. Abschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation in einer Picro-Sirius-Rot Lösung, bevor die Gewebsschnitte entwässert und eingedeckt wurden.

Die Bestimmung der interstitiellen Fibrose erfolgte über eine zusammengesetzte Aufnahme des gesamten linken Ventrikels in 10-facher Vergrößerung mit dem AxioImager.A2 Mikroskop und der ZEN Software 2.3 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D). Größere Gefäße wurden von der Auswertung mit dem Image J 1.48 (National Institutes of health, Bethesda, MD, USA) ausgeschlossen. Es wurde ein konstanter Farb-Schwellenwert für alle Gewebsschnitte eines Färbeprozess ausgewählt und mittels eines Makros halbautomatisch ausgewertet.

Für die Bestimmung der perivaskulären Fibrose in unmittelbarer Nähe von arteriellen Gefäßen wurden mindestens drei querangeschnittene Arterien im linken Ventrikel ausgewählt und in 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Mit dem Programm Image J 1.48 wurde das fibrotische Gefäß mit einem ROI (englisch: *region of interest*) markiert, in dem anschließend die Färbung mit einem konstanten Farbschwellenwert bestimmt wurde. Dieser Wert wurde dann auf die Gefäßgröße normalisiert. Als Maß für die Gefäßgröße wurde die querangeschnittene *Media*-Fläche mittels des *Wand tracing Tool* des Image J Programms bestimmt. Für jedes Herz wurde schließlich ein arithmetisches Mittel aus drei ausgewerteten Arterien gebildet.

2.2.3.2.5 Querschnittsfläche von Kardiomyozyten

Eine kardiale Hypertrophie ist durch eine Vergrößerung der einzelnen Herzmuskelzellen gekennzeichnet. Für eine valide Quantifizierung der Querschnittsfläche von Kardiomyozyten ist es notwendig die Herzen während einer diastolischen Kardioplegie zu entnehmen und zu fixieren. Zu diesem Zweck wurden diese Herzen vor der Organentnahme mit einer kardioplegen Custadiol®-Lösung perfundiert (2.2.2.1).

Nach der Entparaffinisierung und Rehydrierung wurden die Gewebsschnitte zur Permeabilisierung für 8 min in Zitratpuffer (0,01M; pH 6) in einer Mikrowelle bei 500 Watt gekocht. Nach 4-minütiger Abkühlzeit wurden die Schnitte wieder in Zitratpuffer für 4 min gekocht. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt. Nach 20-minütiger Abkühlzeit wurden die Schnitte zweimal in PBS gewaschen und mit jeweils 30 µL RNase-Lösung (5 µg/mL) behandelt und vor der 20-minütigen Inkubation bei 37°C in einem Wärmeschrank mit Parafilm als Verdunstungsschutz abgedeckt. Nach drei 5-minütigen Waschschrritten mit PBS wurden zur Färbung der Zellmembran 30 µL der WGA-Lösung (1:50 in PBS verdünnt) auf jeden Schnitt pipettiert, mit Parafilm abgedeckt und für 30 min bei 37°C im Wärmeschrank im Dunkeln inkubiert. Die Schnitte wurden vor und nach der Kernfärbung mit Roti®-Mount Fluor-Care DAPI zweimal mit PBS gewaschen. Die Einbettung erfolgte mit Vectashield® H-1000, das zugleich ein Ausbleichen von Fluoreszenzsignalen verzögert.

Die Bildaufnahmen am AxioImager.A2 Mikroskop und der ZEN Software 2.3 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D) wurden innerhalb einer Woche durchgeführt, bis dahin war eine lichtgeschützte Aufbewahrung der Schnitte notwendig. Der gesamte linke Ventrikel wurde in 10-20 Bildaufnahmen pro Schnitt bei 20-facher Vergrößerung im blauen (465 nm) und grünen Kanal (517 nm) aufgenommen.

Mit dem Programm Image J 1.48 (National Institutes of health, Bethesda, MD, USA) wurden die Bilder über ein Makro in ein Schwarzweiß-Bild konvertiert und schließlich wurden manuell 50 Zellen pro Schnitt ausgewählt. Es wurde nur solche Myozyten ausgewählt, die transvers angeschnitten waren und eine runde Form sowie einen einzelnen und mittig gelegenen Zellkern aufwiesen. Pro Herz wurde somit ein arithmetisches Mittel aus 50 Zellgrößen gebildet.

2.2.4 Genexpressionsanalyse

2.2.4.1 RNA-Isolation und RNA-Konzentrationsbestimmung

Vor Versuchsbeginn wurde zur Dekontaminierung von RNAsen die Arbeitsfläche sowie Materialien mit RNase ZAP™ gereinigt. Zur Gewinnung der RNA wurde das RNeasy® Mini oder Midi *Kit* mit Proteinase K und DNase-Verdau entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Die Lyse der bei -80°C verwahrten Herzen erfolgte nach dem Transport in flüssigem Stickstoff und mit Überführung in ein mit 600 µL Puffer (mitgelieferter Lysepuffer) gefülltes Reaktionsgefäß. Das Herzgewebe wurde mechanisch unter Verwendung eines Ultra-Turrax® (IKA-Werke, Staufen im Breisgau, D) auf höchster Stufe für ca. 30 s zerkleinert. Nach einem 20-minütigen Proteinase K-Verdau (1:90) bei 55° und der anschließenden RNA-Extraktion in RNase freiem Wasser wurde die Absorption des Eluats bei 230 nm, 260 nm und 280 nm mit dem Spektrophotometer Nanodrop-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit der gewonnenen RNA gemessen.

2.2.4.2 Reverse Transkription und quantitative *realtime* Polymerase Chain Reaction

Für die Umschreibung von 1 µg RNA in komplementäre DNA (englisch: *complementary DNA*, cDNA) wurde die reverse Transkriptase Superscript II™ entsprechend den Herstellerangaben verwendet. In der Negativkontrolle wurde die reverse Transkriptase durch Wasser ersetzt.

Die Quantifizierung der cDNA wurde am StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) unter Verwendung der HotMaster Taq DNA Polymerase mit zugesetztem SYBR®-Green-Farbstoff (1:50) durchgeführt. Der qPCR-Ansatz beinhaltete zudem die Vorwärts- sowie Rückwärtsprimer in einer Konzentration von 0,16 µM und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) in einer Konzentration von jeweils 10 mM. Die cDNA wurde schließlich in einer Menge von 10 ng hinzugegeben.

Die verwendeten Primersequenzen wurden unter Verwendung der *Online-Tools* Primer3Plus [97] und NCBI Primer-BLAST [98] entworfen und können der Tabelle 4 entnommen werden. Eine Analyse der Schmelzkurve der PCR-Produkte diente als Qualitätsnachweis. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der $\Delta\Delta Cq$ -Methode [99]. Die *messenger* RNA (mRNA)-Expression der Zielgene wurde auf die der endogenen Kontrolle, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), normalisiert. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmungen.

Tabelle 4: Verwendete murine Primersequenzen für qPCR. Gene als Gensymbole abgekürzt.

Gen	Vorwärtsprimersequenz (5' → 3')	Rückwärtsprimersequenz (5' → 3')
<i>α-Sma</i>	TGACGCTGAAGTATCCGATA	ATAGAAAGAGTGGTGCCAGA
<i>Anp</i>	ACAGATCTGATGGATTTCAAGAACCTGC	AGTGCGGCCCTGCTTCCTCA
<i>Bnp</i>	GGATCGGATCCGTCAGTCGTT	AGACCCAGGCAGAGTCAGAAA
<i>Ccl2</i>	GCTCAGCCAGATGCAGTTAA	TCTTGAGCTTGGTGACAAAACT
<i>Ccl5</i>	AGCAGCAAGTGCTCCAATCT	CCCCTTCTTCTCTGGGTTG
<i>Ccr2</i>	AGTTCAGCTGCCTGCAAAGA	GCCGTGGATGAACTGAGGTA
<i>Ccr5</i>	AGACATCCGTTCCCCCTACA	GCAGGGTGCTGACATACCAT
<i>Cx3cl1</i>	GCGACAAGATGACCTCACGA	TGTCGTCTCCAGGACAATGG
<i>Cx3cr1</i>	AGTGTGTCGGGTGTCCATTC	GGTAAGGCGAGTCAGCAGTT
<i>Cxcl1</i>	AGTCATAGCCACACTCAAGA	CTTTCTCCGTTACTTGGGGA
<i>Col1a1</i>	GAAGTCAGCTGCATACACAA	CAGTCCAGTTCTTCATTGCA
<i>Col3a1</i>	CTCCCCTGGAATCTGTGAAT	CCCCTCCAGACTTGACAT
<i>Fn1</i>	CTTGTAAGGGTTGTGGTCTG	CAGCTCTCAGTAATGTCACG
<i>Gapdh</i>	TGGCAAAGTGGAGATTGTTG	CATTATCGGCCTTGACTGTG
<i>Has1</i>	CCAAGTATGAGTCTGGACATGAA	TCCCTCATTTCAAAGAGAAGGTAA
<i>Has2</i>	CTGGTGAGACAGAAGAGTCC	GGCAGGGTCAAGCATAGTAT
<i>Has3</i>	GATGTCCAAATCCTCAACAAG	CCCCTAATACATTGCACAC
<i>IL-1β</i>	GGATGAGGACATGAGCACCT	CGTCACACACCAGCAGGTTA
<i>Mmp2</i>	ATGTGGCCAACTACAACCTTC	CCATACTTTTAAGGCCCGAG
<i>Myh6</i>	AGAAGCGCAATGCAGAGTCGGTGAA	GGTCCTGCAGCCGCATTAAGTTCTTCT
<i>Myh7</i>	AAGGCAAAGAAAGGCTCATC	AGACTTTGTCTCATTGGGGA
<i>Tn-c</i>	TCAGTGTGATTGCCATGAAG	ACCATCCAGAGCTGTGATTA
<i>Timp3</i>	GCAGATGAAGATGTACCGAG	ACATCTTGCCTTCATACACG
<i>Vim</i>	GAAGGCGAGGAGAGCAGGATTTCT	AGTGGGTGTCAACCAGAGGAAGTGA

2.2.4.3 Gene Array Analyse

In Kooperation mit Prof. Dr. Köhrer und Dr. Deenen aus dem Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf wurde die Transkriptomanalyse durchgeführt. Die Qualität und Quantität der mittels RNeasy® Midi Kit isolierten RNA wurde im Agilent 2100 *Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) überprüft. Nur RNA mit hohen RNA-Integritäts-Nummern (RIN)-Werten gingen in die Analyse ein. Als Messplattform wurde der *Gene Array GeneChip™ Mouse Gene 2.0 ST* (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) verwendet.

2.2.5 Proteinbiochemie

2.2.5.1 Massenspektrometrie

Die Proteomanalyse wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Stühler und Dr. Poschmann aus dem Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf umgesetzt.

Nach der Proteinisolierung aus dem Herzgewebe wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Silberfärbung visualisiert (Abbildung 11). Dabei wurde ein Teil der Probe (1 μg) zur Qualitätskontrolle der Proteinisolierung in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Ein anderer Teil der Probe (5 μg) wurde über eine kurze Laufstrecke (etwa 4 mm) separiert. Letzteres wurde zur weiteren Probenaufbereitung für die MS-Analyse verwendet: es erfolgte eine Entfärbung der Proteinbanden, die anschließend gewaschen, reduziert, alkyliert und tryptisch verdaut wurden. Die entstehenden Peptide wurden aus dem Gel extrahiert und für die massenspektrometrische Messung vorbereitet.

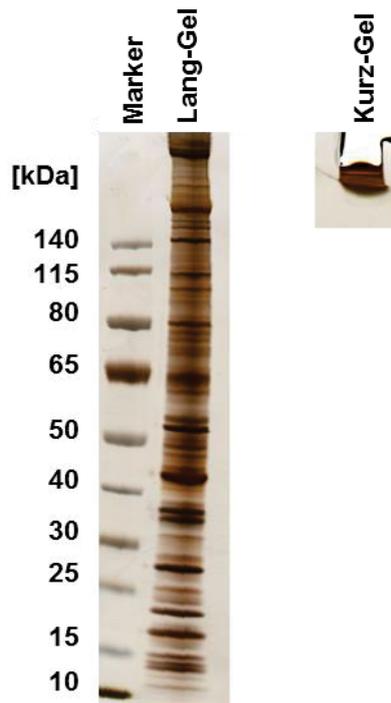


Abbildung 11: Isolierte Proteine aus einem Mauserz. Das Proteinlysate wurde mittels SDS-PAGE in einem Polyacrylamidgel über eine lange und kurze Laufstrecke aufgetrennt und mittels Silberfärbung visualisiert (n = 1).

Material und Methoden

Die extrahierten Peptide wurden über eine UltiMate™ 3000 Rapid Separation Flüssigchromatografie (Thermo Scientific, Idstein, D) separiert. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines Orbitrap Elite™ Hybridmassenspektrometers (Thermo Scientific, Bremen, Germany). Die Datenanalyse wurde mittels der MaxQuant Software (Max Planck Institute of Biochemistry, Planegg, D) und die funktionelle Gen-Annotationsanalyse mittels der Software Perseus (Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, D) durchgeführt. Die Durchführung sowie die anschließende statistische Auswertung erfolgten durch Dr. Poschmann.

2.2.5.2 Hyaluronsäure-Bindeprotein Sandwich ELISA-ähnlicher Assay

Für die Bestimmung der HA-Sekretion der H9C2-Zellen in Abhängigkeit von Isoprenalin-Stimulation und 4-MU-Behandlung wurde das Zellmedium nach 24-stündiger Inkubation abgenommen. Die HA-Menge wurde über ein HABP Sandwich ELISA-ähnliches *Kit* nach Herstellerangaben durch freundliche Unterstützung von Frau Rüter (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, D) gemessen. Die photometrische Messung erfolgte bei 450 nm in dem ELISA-Plate Reader Multiskan™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Die gemessene HA-Menge wurde auf die Proteinmenge der untersuchten Zellen normalisiert. Dafür wurden die Zellen mit einer 0,1 M Natronlauge lysiert und eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt [100]. Die Bestimmung der HA-Menge im Blutplasma erfolgte mittels des gleichen *Kits*. Nachdem das Blut durch Herzpunktion entnommen wurde, erfolgte ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt bei 1500 g. Das im Überstand befindliche Plasma wurde abgenommen und bis zur Messung bei -80°C aufbewahrt. Die gemessene HA-Menge wurde auf das in die Analyse eingegangene Blutplasmavolumen normalisiert.

2.2.5.3 Proteinnachweis von ERK1/2 und pERK1/2 mittels *Western Blot*

Die tiefgefrorenen Herzgewebestückchen wurden in 500 µL PBS mit zugesetzten Protease- (100 µM Phenylmethylsulfonylfluorid, 10 mM Benzamidin) und Phosphatase-Inhibitoren (2 mM Imidazol, 5 mM Natriumfluorid, 4 mM Natriumkaliumtartrat) dreimal für 10 s auf Eis mechanisch mittels eines Ultra-Turrax® (IKA-Werke, Staufen im Breisgau, D) zerkleinert. Anschließend wurde das Homogenat bei 4°C für 15 min bei 10.000 g zentrifugiert. Etwa 400 µL des Überstandes wurden mit einem 3-fach konzentrierten Lämmli-Ladepuffers (6 % Natriumlaurylsulfat (SDS) (w/v), 30 % Glycerol (v/v), 0,015 % Bromphenolblau (w/v), 19,5 mM Tris, pH 6,8) verdünnt.

Material und Methoden

Für die Proteinbestimmung wurden 25 µL des Überstandes im Verhältnis 1:4 mit Wasser verdünnt und nach Herstellerangaben des Pierce™ BCA Protein Assay Kit durchgeführt. Die photometrische Messung erfolgte bei 562 nm im Mikroplattenlesegerät Synergy™ MX (BioTek, Winooski, VT, USA).

Die Proteine wurden mittels einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Standardprotokoll auf einem 15 %-igen Trenngel entsprechend des Molekulargewichts aufgetrennt. Anschließend erfolgte der Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Immobilon®-P PVDF Membran mittels *Western Blot* bei 100 V für 1 Stunde. Die Membran wurde mit den entsprechenden Erstantikörpern, anti-pERK1/2 (1:1000) oder anti-ERK1/2 (1:1000), in Blockmilch (5 % BSA in TBS-T (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween® 20 (v/v), pH 7,6) bei 4°C schwenkend über Nacht inkubiert. Die Membran wurde am nächsten Tag mit Hilfe des Proteindetektionssystems SNAP i.d.® 2.0 (Merck Millipore, Burlington, MS, USA) viermal mit TBS-T gewaschen, 10 min mit dem anti-IgG-HRP Zweitantikörper (1:10.000) in Blockmilch inkubiert und abschließend viermal mit TBS-T gewaschen. Die Chemilumineszenzdetektion erfolgte durch Zugabe des HRP-Substrat Luminata Forte. Die Röntgenfilme wurden für unterschiedliche Zeitspannen belichtet und anschließend mit dem Durchlichtscanner ScanMaker i800plus (Microtek, Hsinchu, TWN) aufgenommen. Die Quantifizierung der Signalstärke wurde mithilfe der Software Image Studio Lite 4.0 (LI-COR Lincoln, NB, USA) durchgeführt.

2.2.5.4 Durchflusszytometrie

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Grandoch und Dr. Homann vom Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf wurden die durchflusszytometrischen Daten erhoben.

Die Blutzellen wurden nach einem Standardprotokoll gefärbt. Die verwendeten Fluorophor-gekoppelten Antikörper zur Charakterisierung der Immunzellen aus dem Herzen können der Tabelle 2 entnommen werden (2.1.2). Die absoluten Zellzahlen wurden durch Messung fluorophor-gekoppelter *Microbeads*, den sogenannten *Flow-Count Fluorospheres*, bestimmt. Als Messplattform wurde das LSRII Durchflusszytometer (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) verwendet.

Die Durchführung sowie die anschließende statistische Auswertung mittels der Kaluza Flow Analysis Software 1.3 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) erfolgten mit freundlicher Unterstützung von Dr. Homann.

2.2.6 Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung der GraphPad Prism 7.0 Software (Software Inc., La Jolla, CA, USA). Sofern nicht anders vermerkt, wurde zum Vergleich zweier Datensätze der ungepaarte *Student's t-test* (*t*-Test) und zum Vergleich mehrerer Datensätze eine *one-way Analysis of Variance* (ANOVA) mit anschließendem Tuckey-Test durchgeführt. Bei Vorliegen von zwei Variablen, wie zum Beispiel das Körpergewicht in Abhängigkeit von Zeit und Behandlung, wurde zum Testen eine *two-way* ANOVA verwendet. Im Fall der *in vitro*-Zellkultur-Experimente wurde die gepaarte *repeated measures* (RM) *one-way* ANOVA durchgeführt. Für die Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit nach Kaplan-Meier wurde der *Log-Rank*-Test eingesetzt. Als statistisch signifikant wurden Signifikanzwerte mit $p < 0,05$ festgelegt. Der Grubb's Tests wurde zur Bestimmung von potentiellen Ausreißern durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (englisch: *standard error of the mean*, SEM) dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Transkriptom- und Proteom-Analysen im genetischen Hypertrophie-Mausmodell

Die Pathogenese der HCM ist nicht vollständig erforscht. Insbesondere ist unklar, welche molekularen Signalkaskaden zwischen den ursächlichen Mutationen und dem klinischen Phänotyp vermitteln. Daher wurden im ersten Teil der Arbeit zunächst Genexpressionsanalysen durchgeführt, um durch Vergleich der Expressionsmuster mit gesunden Wildtyp (WT)-Mäusen neue Kandidatengene zu identifizieren werden, die ursächlich an der Pathogenese beteiligt sein könnten.

Mittels *Gene Array* (3.1.1) und Massenspektrometrie (MS) Analyse (3.1.2) wurden Kandidaten auf Transkriptions- als auch Proteinebene entdeckt, die eine starke Dysregulation in einem genetischen Mausmodell der HCM aufwiesen. Bei dem Modell handelt es sich um 129/SvEv Mäuse, die eine kombinierte Heterozygotie von zwei krankheitsauslösenden *Knockin*-Mutationen, Val606Met (VM/+) und Arg453Cys (RC/+), im Genlocus der schweren Myosinkette (α -MHC) tragen. Diese beiden Sarkomer-Mutationen wurden bei familiären Formen der HCM in betroffenen Menschen identifiziert. Im Vergleich zu einfach heterozygoten Tieren entwickeln VM/RC-Mäuse frühzeitig einen schweren HCM-Phänotyp, der durch eine verschlechterte Pumpfunktion des Herzens und durch frühes Einsetzen des myokardialen *Remodeling* charakterisiert sind. Es wurden männliche VM/RC-Mäuse im Alter von acht Wochen untersucht und gegen geschlechts- und altersadaptierte WT-Mäuse verglichen. In diesem Alter sind noch keine morphologischen oder funktionellen Auffälligkeiten bei den VM/RC-Herzen erkennbar. Somit wurde sichergestellt, dass nur primäre Veränderungen durch die hier verwendeten Analysen abgebildet wurden. Eine ausführliche Beschreibung des Phänotyps ist dem Abschnitt 1.1.3.2 zu entnehmen.

Aufgrund der schwerwiegenden Ausprägung des HCM-Phänotyps wurden die VM/RC-Mäuse als Modell zur Untersuchung der Pathogenese von HCM als geeignet erachtet, sodass sowohl Transkriptom- als auch Proteom-Analysen in diesem Modell erfolgten.

3.1.1 Analyse des Transkriptoms im Herzen

Veränderungen im Transkriptom des Herzens wurden genomweit durch eine *Gene Array* Analyse untersucht und dienen als erste Hinweise für die zugrundeliegenden Mechanismen im Rahmen der Pathogenese der HCM.

In Kooperation mit Prof. Dr. Köhrer und Dr. Deenen aus dem Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf wurde die Transkriptom-Analyse durchgeführt.

Der verwendete *Gene Array* GeneChip™ Mouse Gene 2.0 ST von Affymetrix bildet die Expressionsstärke von 28.000 kodierenden und von 7.000 nicht-kodierenden Transkripten ab. Für die Analyse wurden drei männliche VM/RC-Mäuse untersucht und gegen vier geschlechts- und altersadaptierte WT-Mäuse verglichen. Zum Zeitpunkt der Organentnahme und somit der RNA-Isolation waren die Mäuse beider Gruppen acht Wochen alt. In diesem Lebensalter besteht noch keine Manifestation des HCM-Phänotyps.

Unter diesen Versuchsbedingungen wurde eine Regulation von 754 Transkripten im Herzen von VM/RC-Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren nachgewiesen ($p < 0,05$). Davon zeigten 220 Transkripte eine Abnahme ($< 0,5$ -fach) und 534 Transkripte eine Zunahme ($> 2,0$ -fach) der Genexpression im Vergleich zu WT-Tieren ($p < 0,05$).

Die differentiell exprimierten Gene wurden einer funktionellen Gen-Annotationsanalyse unterzogen. Dafür wurden die Transkripte zunächst in ein webbasiertes Programm namens *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) importiert [101, 102]. Auf Grundlage von hinterlegten Datenbanken werden die Gene den jeweiligen funktionellen Gengruppen zugeordnet und gemäß statistischer Signifikanz bzw. Anreicherung sortiert. Somit ist es möglich, Kandidaten zu identifizieren die im Zusammenspiel mit anderen identifizierten regulierten Genen derselben funktionellen Gengruppe überrepräsentativ vertreten sind und von denen daher eine hohe biologische Relevanz anzunehmen ist.

Nachfolgend werden die drei Kategorien der sogenannten Gen-Ontologien (*GO term*) betrachtet: zelluläres Kompartiment (englisch: *cellular component*, GOCC) (Tabelle 5), biologische Prozesse (GOBP) (Tabelle 6) und molekulare Funktion (GOMF) (Tabelle 7).

Dargestellt sind in Tabelle 5 - Tabelle 7 die jeweiligen Ranglisten (TOP10) für die 10 am stärksten angereicherten *GO terms*, sortiert nach dem berechneten Anreicherungswert (*Enrichment Score*) mit dem dazugehörigen p-Wert.

Ergebnisse

Auffällig war, dass bei der Kategorie zelluläres Kompartiment (Tabelle 5) vor allem Gene, die für den Extrazellulärraum kodieren, differentiell exprimiert vorliegen, wie zum Beispiel *extracellular region part* (GO:0044421) *extracellular matrix* (GO:0031012) und *extracellular region* (GO:0005576).

Tabelle 5: Kategorieale Anreicherungsanalyse: TOP10-Rangliste der GO terms für zelluläres Kompartiment (GOCC). In die Analyse sind Transkripte eingegangen, die im Vergleich der VM/RC-Mauserherzen zu Wildtyp-Mauserherzen (n = 3-4; p < 0,05) eine veränderte Expression aufwiesen.

3rd level GOCC	Enrichment Score	p-Wert
<i>extracellular region part</i>	105,15	2,15E-46
<i>extracellular matrix</i>	82,20	1,99E-36
<i>extracellular region</i>	74,73	3,52E-33
<i>proteinaceous extracellular matrix</i>	68,23	2,34E-30
<i>extracellular space</i>	67,50	4,86E-30
<i>extracellular matrix part</i>	43,67	1,08E-19
<i>collagen</i>	32,57	7,17E-15
<i>cytoplasmic part</i>	24,35	2,65E-11
<i>basement membrane</i>	22,07	2,59E-10
<i>extracellular vesicular exosome</i>	16,24	8,87E-08

Ergebnisse

Auch bei der GO Kategorie biologische Prozesse (Tabelle 6) waren GO *terms*, die im Kontext mit Struktur und Aufbau der EZM stehen, vertreten, so zum Beispiel *extracellular matrix organization* (GO:0030198) an sechster Stelle und *extracellular structure organization* (GO:0043062) an siebter Stelle. Darüber hinaus lagen auch Gene stark angereichert vor, die der Zellmigration dienen, wie etwa *regulation of cell migration* (GO:0030334), *regulation of cell motility* (GO:2000145), *regulation of cellular component movement* (GO:0051270), *regulation of locomotion* (GO:0040012).

Tabelle 6: Kategorieale Anreicherungsanalyse: TOP10-Rangliste der GO *terms* für biologische Prozesse (GOBP). In die Analyse sind Transkripte eingegangen, die im Vergleich der VM/RC-Mausherzen zu Wildtyp-Mausherzen (n = 3-4; p < 0,05) eine veränderte Expression aufwiesen.

3rd level GOBP	Enrichment Score	p-Wert
<i>regulation of cell migration</i>	27,52	1,12E-12
<i>regulation of multicellular organismal process</i>	26,85	2,18E-12
<i>regulation of cell motility</i>	26,40	3,42E-12
<i>regulation of cellular component movement</i>	25,95	5,38E-12
<i>angiogenesis</i>	25,84	6,00E-12
<i>extracellular matrix organization</i>	25,62	7,44E-12
<i>extracellular structure organization</i>	25,50	8,39E-12
<i>regulation of locomotion</i>	24,39	2,56E-11
<i>regulation of response to stimulus</i>	23,85	4,39E-11
<i>developmental process</i>	23,78	4,68E-11

Ergebnisse

Bei der GO Kategorie molekulare Funktion (Tabelle 7) waren in der TOP10-Rangliste wieder viele GO *terms* vertreten, die an der Bindung von EZM-Bestandteilen beteiligt sind, wie etwa *heparin binding* (GO:0008201), *fibronectin binding* (GO:0001968), *extracellular matrix structural constituent* (GO:0005201) und *collagen binding* (GO:0005518). Regulierte Gene, die dem GO *term glycosaminoglycan binding* (GO:0005539) zugeordnet wurden, lagen mit einem *Enrichment Score* von 29,27 am stärksten angereichert vor. Ein wichtiger Vertreter von Glykosaminoglykanen ist die HA.

Tabelle 7: Kategorieale Anreicherungsanalyse: TOP10-Rangliste der GO *terms* für molekulare Funktion (GOMF). In die Analyse sind Transkripte eingegangen, die im Vergleich der VM/RC-Mauserherzen zu Wildtyp-Mauserherzen (n = 3-4; p < 0,05) eine veränderte Expression aufwiesen.

3 rd level GOMF	Enrichment Score	p-Wert
<i>glycosaminoglycan binding</i>	29,27	1,94E-13
<i>carbohydrate derivative binding</i>	29,05	2,41E-13
<i>heparin binding</i>	25,06	1,31E-11
<i>growth factor binding</i>	21,74	3,63E-10
<i>sulfur compound binding</i>	21,73	3,66E-10
<i>fibronectin binding</i>	21,23	6,03E-10
<i>extracellular matrix structural constituent</i>	18,14	1,32E-08
<i>protein binding</i>	16,75	5,34E-08
<i>receptor binding</i>	16,41	7,51E-08
<i>collagen binding</i>	14,90	3,37E-07

Die Validierung der mittels *Gene Array* erhobenen Expressionsdaten erfolgte durch qPCR. Die Liste mit den 754 regulierten Transkripten (p < 0,05) wurde zu diesem Zwecke stringenter gefiltert, sodass nur Gene mit einem p-Wert p < 0,01 betrachtet wurden. Hieraus wurde eine Liste mit 119 regulierten Transkripten generiert, bei denen 16 Gene eine Abnahme (< 0,5-fach) und 103 Gene eine Zunahme (> 2,0-fach) der Expression im Vergleich zu WT-Tieren zeigten.

Aus dieser Liste wurden schließlich 15 Gene ausgewählt, bei denen nach umfangreicher Literaturrecherche eine hohe biologische Bedeutung für die Pathogenese der HCM angenommen wurde. Mit dieser zweiten unabhängigen Methode wurde eine relative

Ergebnisse

Quantifizierung der Genexpression von 15 regulierten Genen (als Gensymbole abgekürzt: *Bgn*, *Cd44*, *Col1a1*, *Col3a1*, *Egr1*, *Fn1*, *Frzb*, *Lum*, *Mmp2*, *Olfr1034*, *Postn*, *Slc24a2*, *Tgfb2*, *Cacna1g*, *Tbx15*) im Vergleich zu WT-Mäusen ermittelt. Hierunter findet sich auch der CD44-Rezeptor, der hauptsächlich an der HA-Signaltransduktion beteiligt ist [70]. Mittels *Gene Array* Analyse wurde für *Cd44* eine signifikant erhöhte Genexpression (2,22-fach) gezeigt. Dieser Befund wurde durch qPCR bestätigt, wobei die gemessene Genexpression hier sogar 10,05-fach erhöht vorlag.

Zur Normalisierung wurde das Referenzgen *Gapdh* verwendet. Die komparative $\Delta\Delta C_t$ -Methode wurde zur Bestimmung der relativen Genexpression eingesetzt [103]. Die Berechnung des Spearman-Koeffizienten ergab auf Grundlage der Expressionsdaten aus *Gene Array* und qPCR eine mittlere positive Korrelation ($r^2 = 0,6559$) mit einem p-Wert von 0,0096 (Abbildung 12).

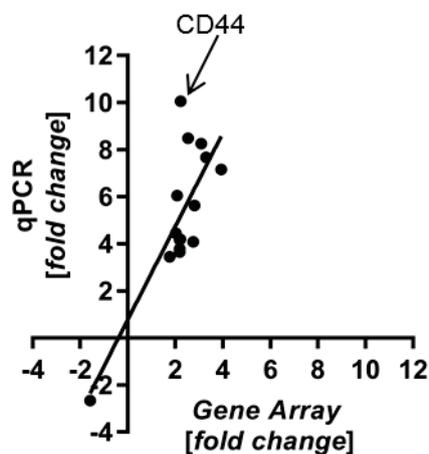


Abbildung 12: Korrelation der Genexpression gemessen durch qPCR und *Gene Array*. Die Mittelwerte der relativen x-fachen Änderung (*fold change*) der Expressionsstärke sind im Vergleich zu Wildtyp-Mauserherzen von 15 regulierten Genen als Streudiagramm dargestellt. Die Messdaten des Rezeptors CD44 sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. Eine entsprechende Regressionslinie ($y = 1,983x + 0,7713$) ist abgebildet.

Zusammenfassend wurden durch die *Gene Array* Analyse 754 Transkripte identifiziert, die eine signifikante Regulation im Herzen von VM/RC-Mäusen noch vor Einsetzen des myokardialen *Remodeling* im Vergleich zu WT-Mäusen zeigten. Diese ließen sich mittels DAVID funktionellen Gengruppen zuordnen, die vorwiegend am Aufbau und Funktion der EZM beteiligt sind. Aber auch Gene, die im funktionellen Zusammenhang mit Zellmigration stehen, lagen stark angereichert vor. Hervorzuheben ist außerdem, dass mittels *Gene Array* und qPCR Analyse der HA-Rezeptor CD44 mit einer erhöhten Expression als signifikant hochreguliertes Transkript identifiziert worden ist.

3.1.2 Analyse des Proteoms im Herzen

Die *Gene Array* Analyse zeigte eine starke Regulation von mRNA-Transkripten, die vornehmlich für Proteine der EZM kodieren. Im nächsten Teil der Arbeit wurde geprüft, ob auch auf Proteinebene Veränderungen der EZM zu beobachten sind. Hierzu wurde eine Massenspektrometrie-basierte Untersuchung des Proteoms im Herzen durchgeführt. In Kooperation mit Prof. Dr. Stühler und Dr. Poschmann aus dem Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf wurde die MS-Analyse durchgeführt. Eine Datenbanksuche mittels MaxQuant (Max Planck Institute of Biochemistry, Planegg, D) lieferte schließlich Informationen über die Identität und Abundanz der untersuchten Peptide und Proteine. Hierbei wurden 1602 Proteine mit mindestens zwei Peptiden identifiziert. Davon sind 957 Proteine, die in beiden Gruppen (jeweils sechs biologische Replikate) mindestens drei gültige Werte aufwiesen, in die quantitative Analyse eingegangen. Als statistischer Test wurde die *Significance Analysis of Microarrays* (SAM) Methode verwendet mit einer *False Discovery Rate* (FDR) von 1 % [104]. Somit zeigten 121 Proteine eine signifikant unterschiedliche Abundanz, davon waren 90 Proteine höher (> 1,7-fach) und 31 Proteine niedriger (< 0,6-fach) abundant in VM/RC-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen. Die *heatmap*, eine häufig verwendete Darstellung zur Visualisierung von großen Datensätzen erhoben durch Transkriptions- oder Proteom-Analysen, und eine hierarchische Klassifizierung zeigten, dass die biologischen Replikate der beiden betrachteten Genotypen, VM/RC und WT, zu homogenen Gruppen übergeordnet wurden und das Proteom beider Gruppen signifikante Unterschiede aufwies (Abbildung 13).

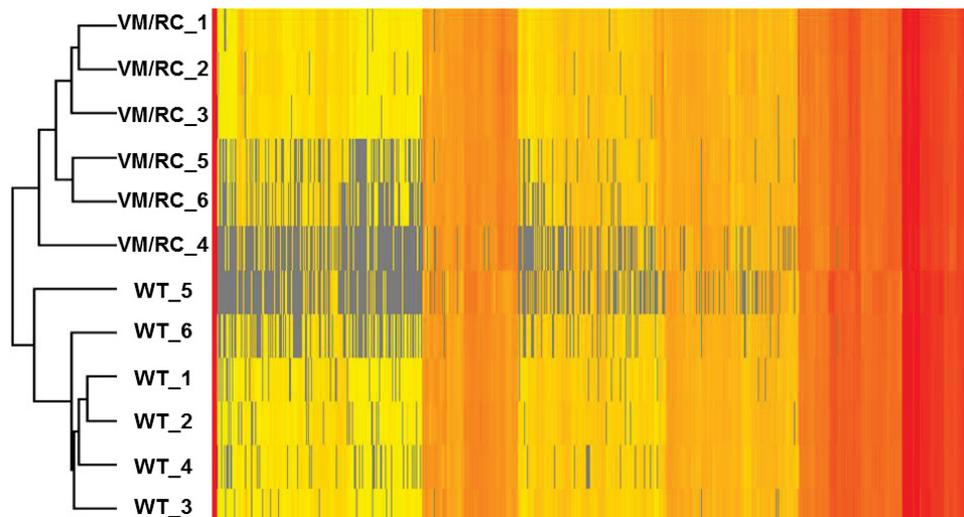


Abbildung 13: Heatmap und hierarchische Klassifizierung. Abgebildet sind die farbcodierten Intensitäten von 957 identifizierten Proteinen aus der massenspektrometrische Analyse von sechs VM/RC- gegen sechs alters-, Mausstamm- und geschlechts-adaptierte Wildtyp (WT)-Mausherzen. Der gelbe Farbbereich zeigt eine relativ höhere Abundanz und der rote Farbbereich zeigt eine relativ niedrigere Abundanz der identifizierten Proteine an. Die hierarchische Klassifizierung ordnet den Proben anhand der Intensitätsprofile eine übergeordnete Gruppe zu.

Ergebnisse

Ähnlich der Transkriptom-Analyse wurden die differentiell abundanten Proteine einer funktionellen Gen-Annotationsanalyse mittels der Software Perseus unterzogen. Die TOP10-Rangliste der beiden GO-Kategorien zelluläres Kompartiment (Tabelle 8) und biologische Prozesse (Tabelle 9) sind mit dem jeweiligen p-Wert dargestellt und nach dem berechneten Anreicherungswert (englisch: *Enrichment Score*) sortiert. Die statistische Auswertung wurde nach der Methode von Benjamini und Hochberg für multiples Testen ausgeführt [105].

Bei der Kategorie zelluläres Kompartiment (Tabelle 8) war auffällig, dass Proteine, die in den Extrazellularraum exportiert werden, eine höhere Abundanz aufwiesen. Beispielsweise fanden sich in dieser Liste folgende GO *terms* wieder: *proteinaceous extracellular matrix* (GO:0031012), *extracellular region* (GO:00055769) und *extracellular space* (GO:0005615).

Tabelle 8: Kategorieale Anreicherungsanalyse: TOP10-Rangliste der GO *terms* für zelluläres Kompartiment (GOCC). In die Analyse sind Proteine eingegangen, die im Vergleich der VM/RC-Mauserherzen zu Wildtyp-Mauserherzen (n = 6) eine veränderte Abundanz aufwiesen.

GOCC <i>slim name</i>	<i>Enrichment Score</i>	p-Wert
<i>cell leading edge</i>	4,16	7,76E-04
<i>AP-type membrane coat adaptor complex</i>	4,16	3,27E-03
<i>proteinaceous extracellular matrix</i>	3,24	1,70E-06
<i>extracellular matrix</i>	2,67	4,25E-06
<i>lipid particle</i>	2,65	4,88E-03
<i>cell surface</i>	2,04	8,69E-05
<i>extracellular region</i>	1,96	1,16E-03
<i>extracellular space</i>	1,92	8,83E-08
<i>cytoskeleton</i>	1,81	3,49E-06
<i>plasma membrane</i>	1,76	3,52E-09

Ergebnisse

Der GO term *extracellular matrix* (GO:0031012) war hinsichtlich des *Enrichment Score* ebenfalls stark vertreten. Diese Proteine wurden in einem *Volcano Plots* (Abbildung 14) dargestellt. Der *Volcano Plot* ist ein Punktdiagramm, dessen X-Achse den Abundanz-Unterschied des jeweiligen Proteins im Vergleich zur Kontrolle (hier: WT-Maus) darstellt und dessen Y-Achse den negativen Logarithmus des p-Werts abbildet. Viele dem GO term *extracellular matrix* (GO:0031012) assoziierten Proteine zeigten im Herzgewebe der VM/RC-Mäuse höhere Abundanzen im Vergleich zum WT, wie zum Beispiel Periostin (*Postn* [12,28-fach]), Asporin (*Aspn* [6,65-fach]), Prolargin (*Prelp* [5,36-fach]), Lumican (*Lum* [4,23-fach]) oder das Kollagen, Typ VI (*Col6a1* [2,04-fach], *Col6a2* [2,18-fach] und *Col6a3* [2,28-fach]).

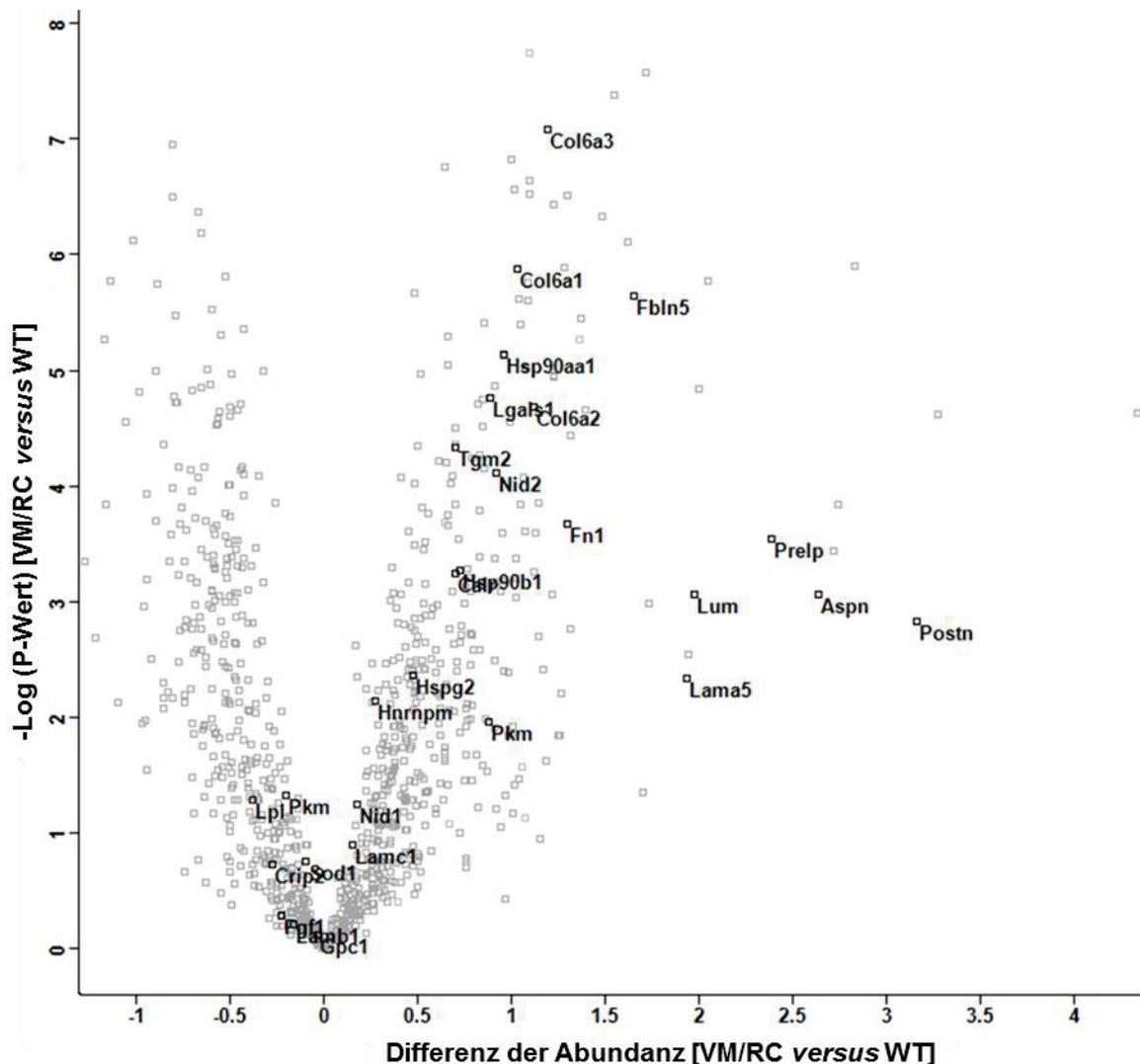


Abbildung 14: Volcano Plot des Vergleichs von VM/RC- und Wildtyp-Mauserherzen. Die Kästchen repräsentieren die 957 identifizierten Proteine, davon wurden 28 Proteine (schwarz-markierte Kästchen) mit dem GO term *extracellular matrix* (EZM) annotiert. Die zugehörigen EZM-Proteine sind als Gensymbole abgekürzt.

Ergebnisse

Auch bei der GO-Kategorie biologische Prozesse (Tabelle 9) wiesen Proteine eine höhere Abundanz auf, die vornehmlich an der EZM-Organisation beteiligt sind, worauf die folgenden GO terms hinweisen: *extracellular structure organization* (GO:0043062) und *extracellular matrix organization* (GO:0030198). Auch mit dem Transport von Kohlenhydraten, *carbohydrate transport* (GO:0008643) assoziierte Proteine zeigten eine erhöhte Abundanz in den VM/RC-Mäusen (*Enrichment Score* von 4,16) auf, was auf einen erhöhten Metabolismus oder Energiebedarf hindeuten könnte. Es wurde zudem deutlich, dass auch viele Proteine höher abundant vorlagen, die an der Zelladhäsion beteiligt sind. In diesem Zusammenhang sind beispielweise die GO terms *cell adhesion* (GO:0007155) und *biological adhesion* (GO:0022610) zu nennen.

Tabelle 9: Kategorieale Anreicherungsanalyse: TOP10-Rangliste der GO terms für biologische Prozesse (GOBP). In die Analyse sind Proteine eingegangen, die im Vergleich der VM/RC-Mauserherzen zu Wildtyp-Mauserherzen (n = 6) eine veränderte Abundanz aufwiesen.

GOBP slim name	Enrichment Score	p-Wert
<i>carbohydrate transport</i>	4,16	7,76E-04
<i>establishment or maintenance of cell polarity</i>	2,77	1,72E-03
<i>extracellular structure organization</i>	2,69	3,26E-04
<i>extracellular matrix organization</i>	2,69	3,26E-04
<i>protein polymerization</i>	2,45	1,68E-03
<i>cell adhesion</i>	2,28	4,81E-08
<i>biological adhesion</i>	2,28	4,81E-08
<i>cytoskeleton organization</i>	2,17	3,27E-10
<i>membrane invagination</i>	2,16	1,05E-03
<i>vesicle-mediated transport</i>	1,71	2,46E-03

Ergebnisse

Im *Volcano Plot* (Abbildung 15) wurden die einzelnen Vertreter, die dem GO *term biological adhesion* (GO:0022610) annotiert wurden, markiert. Hier finden sich auch viele EZM-Proteine wieder, so zum Beispiel Periostin (*Postn* [12,28-fach]), Laminin (*Lama5* [4,60-fach]) oder Fibronektin (*Fn1* [2,48-fach]).

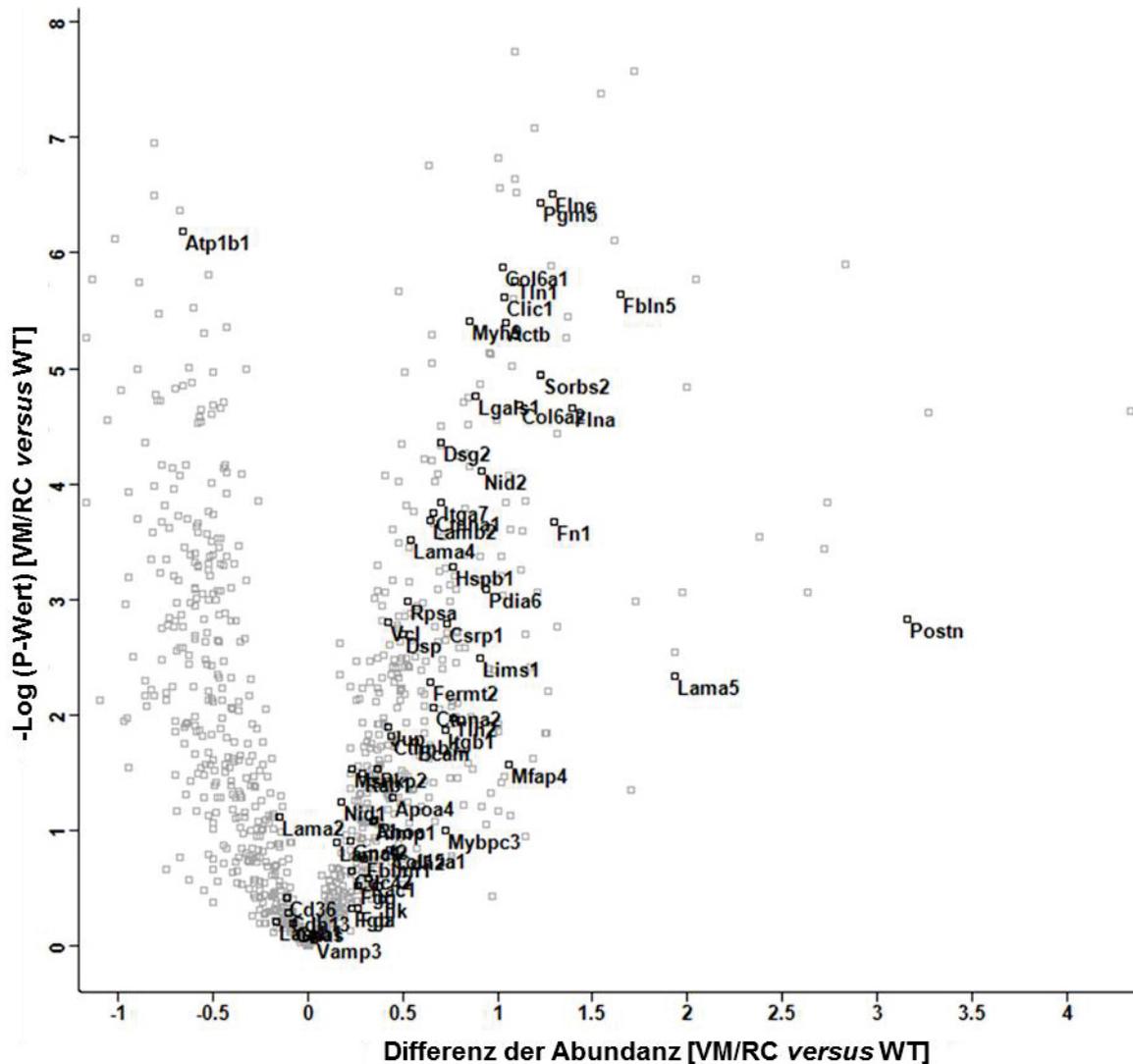


Abbildung 15: Volcano Plot des Vergleichs von VM/RC- und Wildtyp-Mauserherzen. Die Kästchen repräsentieren die 957 identifizierten Proteine, davon wurden 62 Proteine (schwarz-markierte Kästchen) mit dem GO *term biological adhesion* (EZM) annotiert. Die zugehörigen Proteine sind als Gensymbole abgekürzt.

Zusammenfassend wurden durch die MS-Analyse 121 Proteine identifiziert, die eine signifikant veränderte Abundanz im Herzen von VM/RC-Mäusen noch vor Einsetzen des myokardialen *Remodeling* im Vergleich zu WT-Mäusen zeigen. In Übereinstimmung mit den Daten aus der Transkriptom-Analyse, wurde eine wichtige Rolle der EZM-Proteine während der frühen Pathogenese für HCM deutlich.

3.1.3 Gegenüberstellung von Transkriptom- und Proteomanalyse

Sowohl die Transkriptom- als auch Proteom-Analyse im HCM-Modell von 8 Wochen alten VM/RC-Mäusen legten nahe, dass den EZM-Proteinen noch vor Manifestation des myokardialen *Remodeling* eine wichtige Rolle zuteilwurde. Dies wurde durch GO-Annotation der regulierten Transkripte bzw. Proteine deutlich.

Ein direkter Vergleich beider Methoden ist nur unter Vorbehalt möglich, da die statistische Auswertung unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt wurde. Bei der Transkriptom-Analyse wurde für die GO-Annotation ein p-Wert von 0,05 und für die Validierung mittels qPCR ein p-Wert von 0,01 betrachtet, während in der Proteom-Analyse eine FDR von 0,01 festgelegt wurde. Auch die Grenzen hinsichtlich x-facher Hoch- bzw. Runterregulation wurden unterschiedlich definiert. Die Grenzen für die Transkriptom-Analyse (> 2,0-fach & < 0,5-fach) wurden im Vergleich zur Proteom-Analyse (> 1,7-fach & < 0,6-fach) stringenter gesetzt.

Nichtsdestotrotz wurden unter diesen ungleichen Bedingungen in beiden Fällen eine ähnliche Gesamtanzahl an regulierten Transkripten (119) bzw. Proteinen (121) identifiziert (Tabelle 10).

Tabelle 10: Vergleich von Transkriptom- und Proteom-Daten. Dargestellt sind die absoluten Zahlen der identifizierten und regulierten Transkripte bzw. Proteine unter den jeweiligen statistischen Bedingungen.

Analyse des	Gesamtanzahl der regulierten Gene / Proteine	Anzahl der hoch-abundanten Gene / Proteine	Anzahl der niedrig-abundanten Gene / Proteine
Transkriptoms	119	103 (> 2,0-fach, p < 0,01)	16 (< 0,5-fach, p < 0,01)
Proteoms	121	90 (> 1,7-fach, FDR < 0,01)	31 (< 0,6-fach, FDR < 0,01)

Die identifizierten Gene bzw. Proteine mit einer veränderten Abundanz beider Datensätze wurden in einem Venn-Diagramm direkt verglichen (Abbildung 16). Hierbei zeigte sich, dass 8 Einträge in beiden Listen höher abundant waren: Dihydropyrimidinase-like 3 (*Dpysl3*), Kollagen, Typ VI, $\alpha 3$ (*Col6a3*), Asporin (*Aspn*), Kollagen, Typ VI, $\alpha 1$ (*Col6a1*), Fibronectin-1 (*Fn1*), Lumican (*Lum*), Microfibrillar-associated Protein-4 (*Mfap4*) und Periostin (*Postn*). Es handelte sich dabei um Gene, die hauptsächlich für Proteine aus dem Extrazellularraum kodieren. Das Gen und Protein für die Glutathion S-Transferase $\kappa 1$ (*Gstk1*) wurde hingegen in beiden Datensätzen als niedrig abundantes Gen bzw. Protein identifiziert.

Ergebnisse

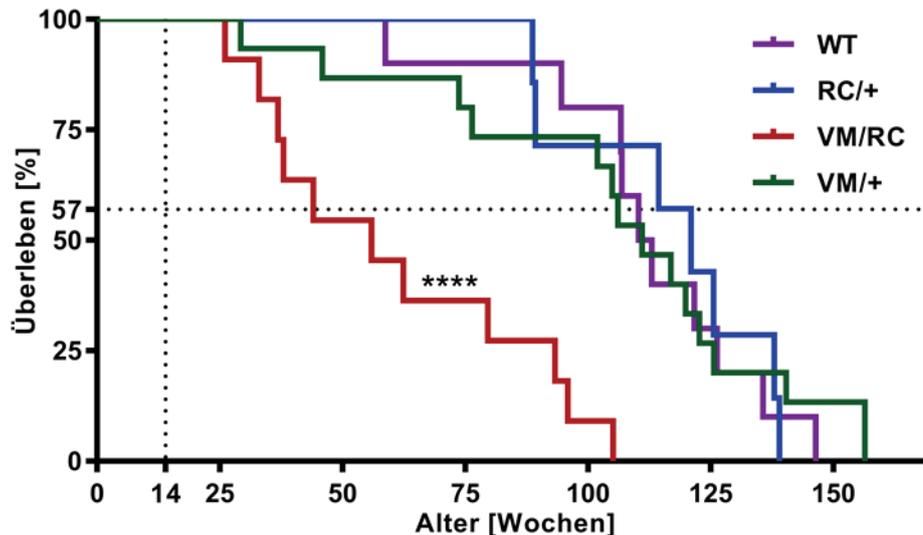


Abbildung 17: Kaplan-Meier Überlebenskurve der (VM/+)-, (RC/+)-, VM/RC- und Wildtyp (WT)-Mäuse aus der Würzburger Zucht. Gepunktete Linien markieren Überlebenswahrscheinlichkeit von Jungtieren im Alter von 14 Tagen aus der Düsseldorfer Zucht (VM/VM x RC/+). n = 7-11; Log-Rank-Test; **** p < 0,0001.

Aus der Verpaarung von homozygoten VM/VM- mit heterozygoten (RC/+)-Mäusen gingen zwar mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % sowohl (VM/+)- und als auch VM/RC-Mäuse hervor, auffällig war aber, dass bei den Jungtieren aus der Düsseldorfer Zucht bis zu einem Lebensalter von 14 Tagen die Überlebenswahrscheinlichkeit nur noch bei 57 % lag (Abbildung 17, siehe gepunktete Linie). In diesem frühen Lebensalter der Mäuse war noch keine Biopsierung zwecks Genotypisierung erfolgt, sodass man bei diesen Jungtieren nicht hinsichtlich des Genotyps VM/+ und VM/RC differenzieren konnte. Da (VM/+)-Tiere nur eine milde Form der HCM entwickelten, war von einer normalen Lebenserwartung auszugehen, sodass die hohe Sterblichkeit unter den Jungtieren aus der (VM/VM x RC/+)-Zucht überwiegend Nachkommen des VM/RC-Genotyps zugerechnet werden darf. Unterschiedliche Haltungsbedingungen oder genetischer *drift* könnten für die erhöhte Mortalität ursächlich sein. Diese Auffälligkeit war Grundlage für die Entscheidung das Mausmodell für die folgenden Experimente zu wechseln. Als weit verbreitetes und etabliertes Hypertrophie-Modell gilt die TAC. Die zuvor in den VM/RC-Mäusen mittels *Gene Array* (3.1.1) und MS-Analyse (3.1.2) identifizierte Kandidatengene wurden folglich in Mäusen nach TAC untersucht und validiert (3.1.5).

3.1.5 Validierung der identifizierten Kandidatengene im Hypertrophie-Mausmodell nach operativer Aortenstenose

Sowohl die Transkriptom- als auch Proteom-Analyse zeigte eine starke Veränderung der Zusammensetzung der EZM auf. Ein wichtiger Hauptbestandteil der EZM ist das Glykosaminoglykan HA, das vorwiegend von Fibroblasten in den Extrazellularraum des

Ergebnisse

Gewebes sezerniert wird. Das Polysaccharid HA ist nicht genetisch kodiert und kann daher weder mittels *Gene Array* noch MS detektiert werden. Bei verschiedenen kardialen Herzerkrankungen, insbesondere bei Myokardinfarkt oder Atherosklerose, konnte bereits gezeigt werden, dass diesem Molekül eine hohe Bedeutung in der Pathogenese zukommt [72, 73]. Weiterhin war der GO *term glycosaminoglycan binding* in der Kategorie molekulare Funktion der am stärksten angereicherte GO *term* im *Gene Array*. In diesem Kontext wurde außerdem der HA-Rezeptor CD44, der maßgeblich an der HA-Signaltransduktion beteiligt ist, mit einer erhöhten Expression als signifikant reguliertes Transkript mittels *Gene Array* und qPCR identifiziert.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb angenommen, dass der HA in der Pathogenese der kardialen Hypertrophie eine wichtige Rolle zukommen könnte, die nachfolgend genauer charakterisiert wurde. Zunächst wurde die Genexpression der HA-produzierenden Proteine, *Has*-Isoform 1 bis 3, in WT-Mäusen des Inzucht Mausstamms C57BL/6J basal und nach *sham*- sowie TAC-OP untersucht (3.1.5.1).

3.1.5.1 Untersuchung der Genexpression der *Has*-Isoformen 1 bis 3 im Herzen

Um nachfolgend die Genexpressionsdaten der *Has*-Isoformen 1 bis 3 vergleichend analysieren und bewerten zu können, wurde zunächst basal, also ohne OP, die Hauptisoform im Herzen von C57BL/6J WT-Mäusen mittels qPCR bestimmt (Abbildung 18).

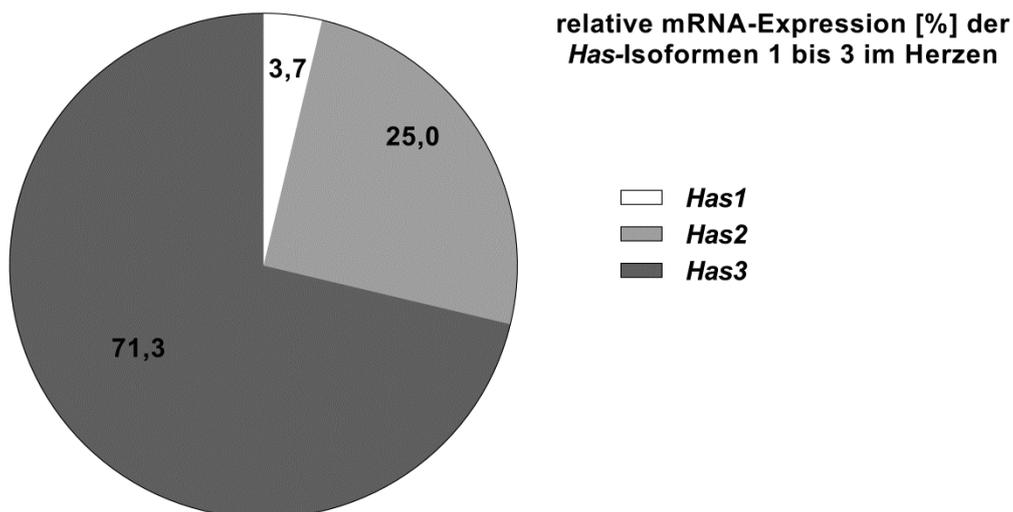


Abbildung 18: Relative *Has1-3* mRNA-Expression im gesunden Herzen von C57BL/6J Mäusen. Mittels quantitativer PCR wurde die Expressionsstärke der *Has*-Isoformen 1 bis 3 bestimmt. Als Referenzgen wurde *Gapdh* verwendet. Dargestellt als gerundete Mittelwerte. n = 4.

Ergebnisse

Diese Expressionsdaten dienten als erster Hinweis bezüglich ihrer Bedeutung im Herzen, aber auch andere Parameter spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von HA, wie etwa Halbwertszeit, Aktivität der HAS-Proteine oder auch die Expression der HA-abbauenden Enzyme, der sogenannten Hyaluronidasen (HYAL).

Mittels quantitativer PCR und unter Berücksichtigung der jeweiligen Effizienzen der Primer-Bindungen wurde gezeigt, dass im Herzen die *Has1*-Isoform mit einem relativen Anteil von 3,7 % nur marginal exprimiert vorlag. Im Vergleich dazu war die *Has2*-Isoform mit 25,0 % moderat exprimiert und somit stellte die *Has3*-Isoform mit 71,3 % die Hauptisoform dar.

Im nächsten Schritt wurde nun die Genexpression der *Has*-Isoformen 3 Tage nach TAC-OP (englisch: *3 days post TAC*, 3dpTAC) im Herzen von männlichen, 16 Wochen alten WT-Mäusen untersucht. Als Kontrollgruppe dienten gleichgeschlechtliche und gleichaltrige scheinoperierte WT-Mäuse (englisch: *3 days post sham*, 3dpSham) (Abbildung 19). Eine signifikante Hochregulation der Genexpression war nur bei *Has2* zu beobachten. Diese Isoform scheint im Herzen von besonderer Bedeutung zu sein, da eine kongenitale Deletion des *Has2*-Gens im Mausmodell letal verläuft, im Gegensatz zu den anderen beiden *Has*-Isoformen, *Has1* und *Has3* [71].

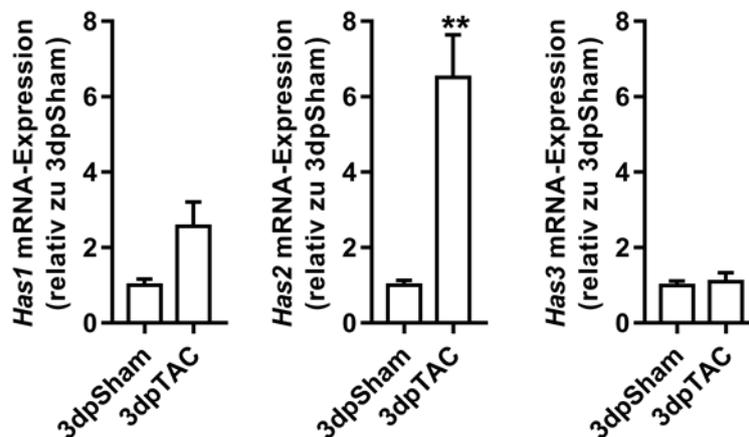


Abbildung 19: Kardiale mRNA-Expression von *Has1*, *Has2* und *Has3* 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC) bzw. nach Schein-Operation (3dpSham). Als Referenzgen wurde *Gapdh* verwendet. Dargestellt als Vielfaches der Kontrolle (hier: 3dpSham); Mittelwert \pm SEM; $n = 5 - 11$; t -Test; ** $p < 0,001$.

Die *Has2*-Isoform liegt also im Hypertrophie-Mausmodell während der Akutphase, 3 Tage nach TAC, reguliert vor und berechtigt somit zur Annahme, dass auch die HA *per se* eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Hypertrophie spielt.

3.2 Rolle der Hyaluronsäure im Hypertrophie-Zellmodell

Im ersten Teil der Arbeit (3.1) wurde die HA als potentiell wichtiges Molekül für die Vermittlung kardialer Hypertrophie identifiziert. Ihre Funktion und Bedeutung für das Myozytenwachstum wurde zunächst in einem *in vitro*-Zellmodell untersucht. Zellsysteme haben den großen Vorteil, dass äußere Einflussfaktoren konstant gehalten werden und somit unter reproduzierbaren Bedingungen homogene Zellpopulationen gezüchtet werden. Damit kann die Streuung der einzelnen Messwerte im Vergleich zur *in vivo*-Situation reduziert werden.

Die H9C2-Kardiomyoblasten gelten als etabliertes Hypertrophie-Zellmodell und werden in der Forschung an kardialer Hypertrophie vielfach verwendet. Die Zellen wurden ursprünglich aus dem embryonalen Herzgewebe einer BD1X Ratte isoliert. Nach Katecholamin-Behandlung mit Isoprenalin hypertrophieren die Zellen, was unter anderem durch mikroskopische Aufnahmen nachzuweisen ist.

Um die Rolle von HA *in vitro* zu untersuchen wurden H9C2-Zellen nach Stimulation mit Isoprenalin zusätzlich mit 4-MU behandelt, das durch kompetitive Substrathemmung die HA-Synthese blockiert. Die Zellen wurden wie bereits beschrieben kultiviert und behandelt (2.2.1.1). Nachfolgend wurde der Hypertrophie-Grad betrachtet (3.2.1) und als Wirksamkeitsnachweis wurde die sekretierte HA im Zellüberstand gemessen (3.2.2).

3.2.1 Effekt von 4-Methylumbelliferon auf das Größenwachstum von H9C2-Zellen nach Isoprenalin-Stimulation

Isoprenalin ist ein positiv inotroper Wirkstoff, der in der Forschung häufig eingesetzt wird um über β -adrenerge Stimulation eine Hypertrophie von H9C2-Zellen zu induzieren. Die Zellen wuchsen in einem *Monolayer* und nur Zellen mit einem einzelnen Zellkern und ohne Kontakt zu Nachbarzellen wurden für die Quantifizierung berücksichtigt.

Nach einer 24-stündigen Isoprenalin-Stimulation (100 μ M) bzw. 4-MU-Behandlung (100 μ M) wurde die Zellgröße nach Phalloidin-Färbung mit einem Bildverarbeitungsprogramm anhand fluoreszenz-mikroskopischer Aufnahmen bestimmt (2.2.3.1.1). Dabei wurde, wie erwartet, bei den Isoprenalin-stimulierten H9C2-Zellen eine Vergrößerung der Zellgröße um durchschnittlich $39,6 \pm 5,42$ % ($p = 0,0003$) im Vergleich zu unbehandelten H9C2-Zellen erzielt (Abbildung 20). Durch eine einfache 4-MU-Behandlung sowie in Kombinationsbehandlung mit Isoprenalin wurden jedoch keine Veränderung bezüglich Zellgröße beobachtet.

Ergebnisse

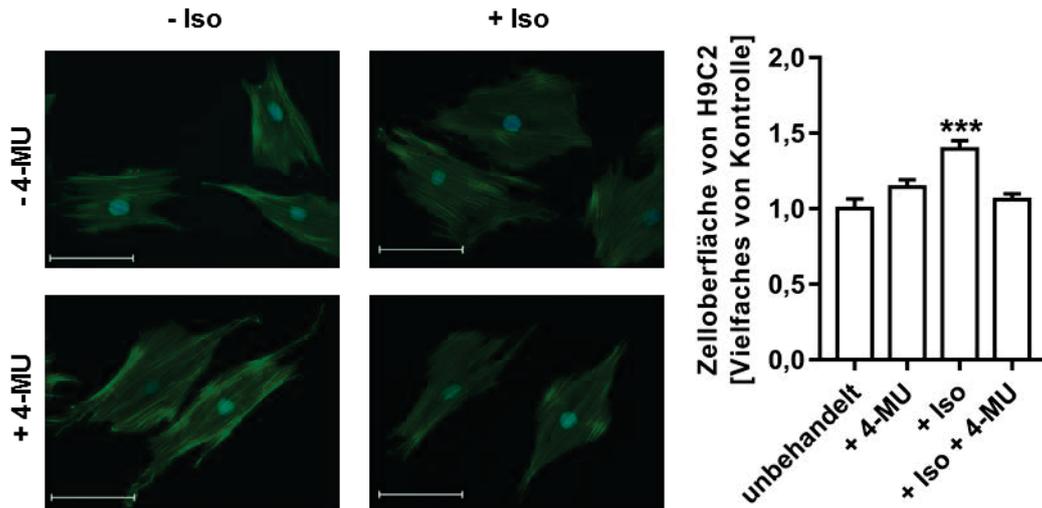


Abbildung 20: Zellgröße von H9C2-Zellen nach Hypertrophie-Stimulation und 4-Methylumbelliferon (4-MU)-Behandlung. Repräsentative Aufnahmen der Phalloidin-Färbung von H9C2-Zellen (Maßstabsbalken entspricht 100 µm). Quantifizierung der Zellgröße von H9C2-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit bzw. ohne Isoprenalin (Iso, 100µM) und 4-MU (100µM). Dargestellt als Vielfaches der Kontrolle (hier: unbehandelt); Mittelwert ± SEM; n = 6; *RM one-way ANOVA*; ***p < 0,001 gegen Kontrolle.

3.2.2 Effekt von 4-Methylumbelliferon auf die Hyaluronsäure-Synthese in H9C2-Zellen

Um eine 4-MU-vermittelte Inhibition der HA-Synthese in H9C2-Zellen nachzuweisen, wurde nach einer 24-stündigen Isoprenalin-Stimulation (100 µM) bzw. 4-MU-Behandlung (100 µM) die HA Konzentration im Zellüberstand gemessen. Dafür wurde ein HABP *Sandwich* ELISA-ähnlicher Assay verwendet, bei dem HABP-beschichtete Latexpartikel nach Bindung der HA aus dem Probenmaterial agglutinieren und eine Trübung der Lösung verursachen. Der Trübungsgrad ist proportional zur HA-Konzentration. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle und wurden mit Isoprenalin-stimulierten, mit 4-MU-behandelten und mit Zellen nach Doppelbehandlung mit 4-MU und Isoprenalin verglichen. Nach einer 24-stündigen Behandlungsdauer wurde der Zellüberstand für die HA-Konzentrationsmessung abgenommen und die Zellen wurden für eine Proteinkonzentrationsbestimmung mittel BCA Assay lysiert. Die gemessene HA-Konzentration wurde schließlich auf die Gesamtproteinmenge normiert.

Ergebnisse

Eine signifikant erniedrigte HA-Sekretion von durchschnittlich $17,09 \pm 2,03$ % ($p = 0,0409$) im Überstand der H9C2-Zellen 24 Stunden nach 4-MU-Behandlung wurde somit bestätigt (Abbildung 21). Allerdings wurde dieser Effekt nicht in den H9C2-Zellen nach Doppelbehandlung mit Isoprenalin und 4-MU reproduziert. Hierfür könnten aber auch andere Faktoren ursächlich sein, wie etwa Freisetzung von intrazellulärer HA durch erhöhte Zytotoxizität von Isoprenalin.

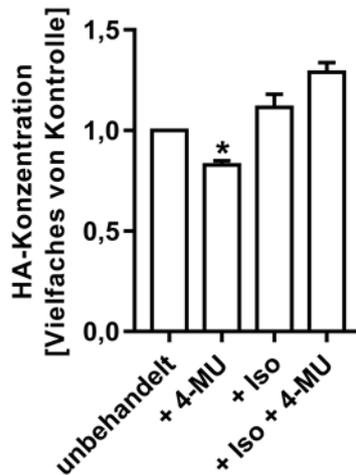


Abbildung 21: Hyaluronsäure (HA)-Sekretion in H9C2 Zellen. Konzentrationsbestimmung sekretierter HA im Zellüberstand von H9C2 Zellen nach 24-stündiger Hypertrophie Stimulation durch Isoprenalin (Iso, $100\mu\text{M}$) und 4-Methylumbelliferon (4-MU, $100\mu\text{M}$) Behandlung mittels HA-Bindeprotein *Sandwich* ELISA-ähnlichem Assay. Dargestellt als Vielfaches der Kontrolle (hier: H9C2 unbehandelt); Mittelwert \pm SEM; $n = 3$; *RM one-way ANOVA*; * $p < 0,05$ gegen Kontrolle.

Somit wurde gezeigt, dass 4-MU einen inhibitorischen Effekt auf die HA-Synthese in nicht-stimulierten H9C2 Zellen ausübt. In Isoprenalin-stimulierten Zellen hingegen war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar, dem könnten allerdings noch andere Ursachen zugrunde liegen. Auffällig war jedoch, dass die Isoprenalin-vermittelte Hypertrophie-Induktion durch die Zugabe von 4-MU verhindert wurde.

3.3 Rolle der Hyaluronsäure im Hypertrophie-Mausmodell nach operativer Aortenstenose und 4-Methylumbelliferon-Behandlung

Im nächsten Schritt sollte die Rolle des HA-Synthese-Inhibitors 4-MU bei der Hypertrophie-Entwicklung *in vivo* untersucht werden. Vorteile eines *in vivo*-Modells sind, dass eine Arbeitshypothese in einem komplexen Organismus geprüft werden kann. Außerdem können im Tiermodell auch translationale Therapieansätze für den Menschen getestet werden. Dafür wurden WT-Mäuse des Inzuchtstamms C57BL/6J nach TAC-OP genutzt. In der vorliegenden Arbeit wurde bereits für dieses Modell eine erhöhte *Has2* mRNA-Expression 3 Tage nach TAC-OP gezeigt (3.1.5.1).

Zunächst wurde das TAC-Modell durch Messung des maximalen Druckgradienten im Aortenbogen validiert (3.3.1). Die Mäuse wurden zudem nach Behandlung mit dem HA-Synthese-Inhibitor 4-MU morphologisch sowie funktionell untersucht.

Nachfolgend wurden verschiedene Parameter betrachtet, die zur Beurteilung herangezogen wurden, welche Rolle die HA während einer Hypertrophie spielt. Zwei Nachbehandlungszeiträume wurden untersucht, 3 Tage (3dpTAC) und 7 Wochen nach TAC-OP (7wpTAC) um akute und chronische Veränderungen im Herzen zu detektieren. Für den Akutzeitraum, 3 Tage nach TAC-OP, wurden scheinoperierte Mäuse (3dpSham) als Kontrollgruppe inkludiert um Effekte eines Operationstraumas auszuschließen. Unter anderem war es bei einer 4-MU-Behandlung über die Nahrungsaufnahme wichtig das Körpergewicht der Mäuse zu dokumentieren und kontrollieren, da ein massiver Gewichtsverlust, vor allem zu Versuchsbeginn, in der Literatur beschrieben ist (3.3.2) [87]. Um die Sicherheit der Substanz 4-MU im Tiermodell zu gewährleisten, wurde zudem eine Überlebensrate aufgetragen (3.3.3). Mittels histologischer Färbungen, molekularbiologischer Methoden und echokardiografischer Messungen wurde das Herz morphologisch und funktionell auf Veränderungen untersucht (3.3.4 bis 3.3.7). Dabei wurde das Augenmerk vor allem auf den Fibrose- und Hypertrophie-Grad sowie den Inflammationsstatus gelegt. In der Literatur gibt es zunehmend Hinweise für eine bedeutende Beteiligung von entzündlichen Prozessen während der Pathogenese einer myokardialen Hypertrophie [18-20]. Daher wurden die Immunzellen aus Herz und Blut zusätzlich mittels Durchflusszytometrie analysiert (3.3.8).

3.3.1 Operative Aortenstenose als *in vivo*-Hypertrophie-Mausmodell

Zunächst wurde überprüft, ob beide Gruppen eine Aortenstenose gleichen Ausmaßes erlitten haben. Hierfür wurde eine Doppler-Ultraschalluntersuchung durchgeführt und aus der Flussgeschwindigkeit des Blutes an der Stenose der maximale Druckgradient (englisch: *maximal pressure gradient*, PG_{max}) im Aortenbogen bestimmt (Abbildung 22). Dieser Parameter dient als Maß für eine Aortenstenose.

Sieben Wochen nach TAC-OP war der durchschnittliche PG_{max} nicht signifikant unterschiedlich. Bei den Kontrolltieren betrug der Mittelwert $69,67 \pm 4,02$ mmHg und bei den 4-MU-behandelten Mäusen $77,02 \pm 4,73$ mmHg ($p = 0,4293$).

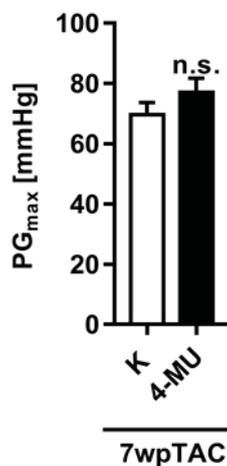


Abbildung 22: Maximaler Druckgradient im Aortenbogen 7 Wochen nach operativer Aortenstenose (7wpTAC). Der maximale Druckgradient (PG_{max} in mmHg) wurde in 4-Methylumbelliferon-behandelten Mäusen (4-MU) und unbehandelten Kontrollmäusen (K) mittels Doppler-Ultraschalluntersuchung bestimmt. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; $n = 13 - 15$; t -Test; n. s. (nicht signifikant) $p > 0,05$.

Dieser Befund bestätigte das experimentell-induzierte Hypertrophie-Mausmodell und berechtigte somit zum Vergleich beider Behandlungsgruppen.

3.3.2 Dokumentation des Körper- und Herzgewichts sowie der Tibiallänge

Wie bereits erwähnt, war insbesondere zu Versuchsbeginn die Akzeptanz der Mäuse für das 4-MU-versetzte Futter gering. Um dem entgegenzuwirken, wurde das Futter beider Gruppen mit Schokoladenaroma angereichert. Durch diese Maßnahme war allerdings ein Gewichtsverlust der Mäuse nicht zu verhindern. Daher wurde während der gesamten Versuchsdauer für den Akutzeitraum, also 3dpSham und 3dpTAC, das Körpergewicht der Mäuse dokumentiert und dementsprechend die Futtermenge kontrolliert.

Ergebnisse

Die 4-MU-behandelten Mäuse erhielten Futter *ad libitum*, während die Mäuse der Kontrollgruppe körperrgewichtsadaptiert zu der 4-MU-Gruppe gefüttert wurden. Folglich waren während der gesamten Versuchsdauer keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Körpergewichts unter 4-MU-Behandlung detektierbar, weder bei den scheinoperierten noch bei den Mäusen nach TAC-OP (Abbildung 23).

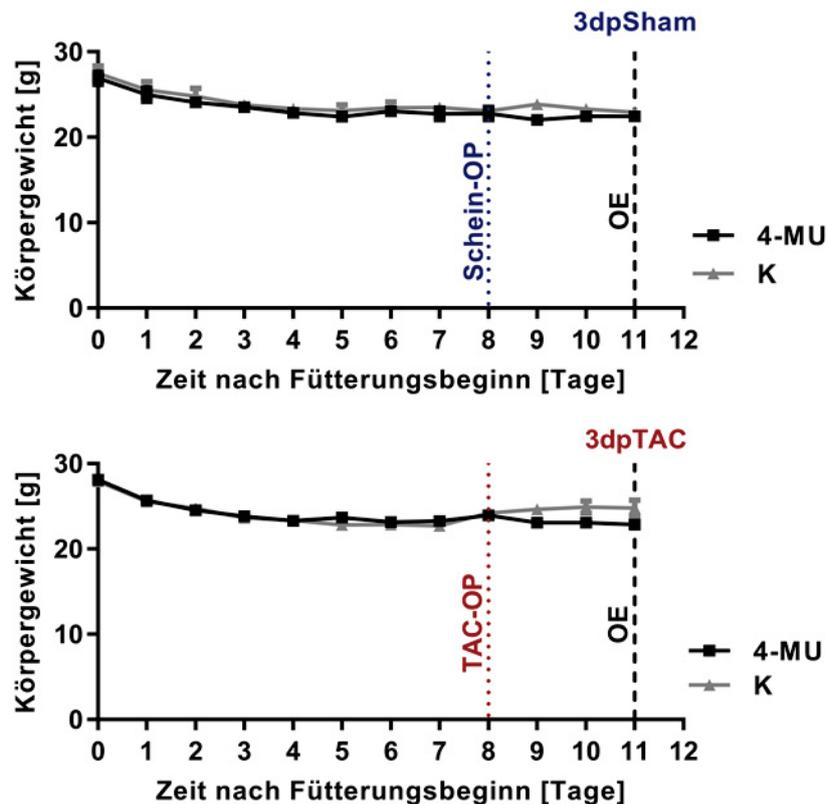


Abbildung 23: Körpergewicht während Behandlungsverlauf für den Akutzeitraum, 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC) bzw. nach Schein-Operation (3dpSham). Das Körpergewicht beider Gruppen wurde ab Fütterungsbeginn (Tag 0) bis zur Organentnahme (OE am Tag 11) in 4-Methylumbelliferon-behandelten Mäusen (4-MU) und unbehandelten Kontrollmäusen (K) täglich dokumentiert. Die blaue bzw. rote Linie markiert die Schein- bzw. TAC-Operation am 8. Versuchstag. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; n = 5 – 11; two-way ANOVA.

Zu beachten ist, dass beide Gruppen bis zum fünften Tag nach Fütterungsbeginn eine kontinuierliche Gewichtsabnahme zeigten und danach allmählich wieder ein Plateau erreichten. Zudem waren keine signifikanten Unterschiede kurz vor der Organentnahme in dem finalen Körpergewicht und der Tibiallänge, der die Länge des Unterschenkelknochens wiedergibt und als repräsentativer Parameter für das körperliche Wachstum dient, zu beobachten (Abbildung 24).

Ergebnisse

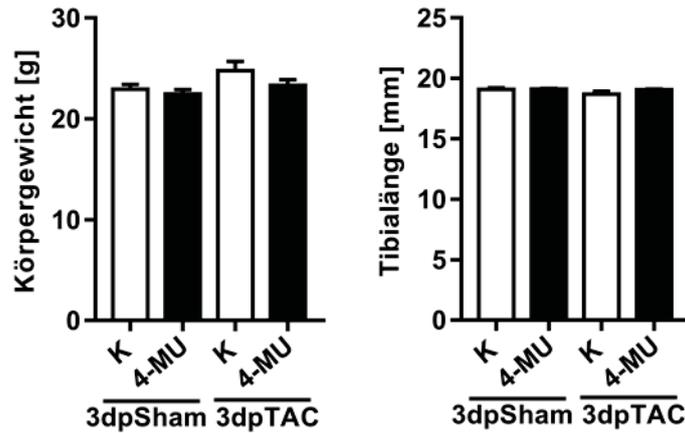


Abbildung 24: Finales Körpergewicht und Tibialänge für den Akutzeitraum, 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC) bzw. nach Schein-Operation (3dpSham). Verglichen wurden 4-Methylumbelliferon-behandelte Mäu (4-MU) und unbehandelte Kontrollmäu (K) der beiden Gruppen, 3dpSham und 3dpTAC, bei Versuchsende. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; $n = 5 - 11$; *one-way ANOVA*.

Bei dem langen Nachbehandlungszeitraum, 7 Wochen nach TAC-OP, wurde Ähnliches beobachtet (Abbildung 25). Initial zeigte sich binnen der ersten 8 Tage nach Fütterungsbeginn, also bis zum Zeitpunkt der TAC, in beiden Gruppen ein großer Gewichtsverlust.

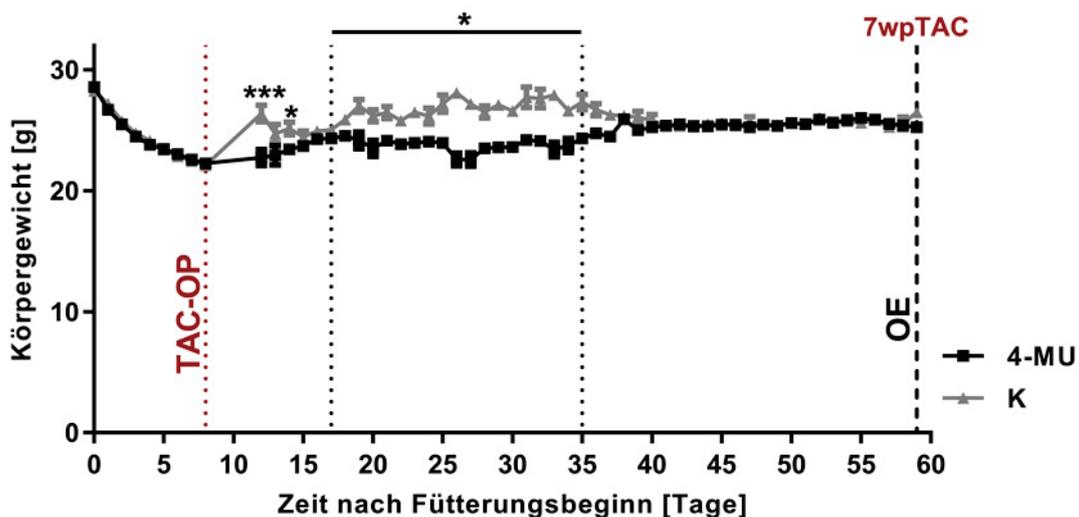


Abbildung 25: Körpergewicht während Behandlungsverlauf für den langen Nachbeobachtungszeitraum, 7 Wochen nach operativer Aortenstenose (7wpTAC). Das Körpergewicht wurde ab Fütterungsbeginn (Tag 0) bis zur Organentnahme (OE am Tag 59) in 4-Methylumbelliferon-behandelten Mäu (4-MU) und unbehandelten Kontrollmäu (K) fast täglich dokumentiert. Die rote Linie markiert die TAC-Operation am 8. Versuchstag. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; $n = 13-15$; *two-way ANOVA*.

Nach dem operativen Eingriff wurden beide Behandlungsgruppen *ad libitum* gefüttert. Da das Körpergewicht erneut divergierte (Tag 26 nach Fütterungsbeginn mit einer maximalen Mittelwerts-Differenz von 5,52 g) wurde die Futtermenge der unbehandelten Mäu wieder kontrolliert, um das durchschnittliche Körpergewicht beider Gruppen anzuzeigen. Diese

Ergebnisse

Maßnahme war erfolgreich, sodass ab Tag 36 nach Fütterungsbeginn das gemittelte Körpergewicht beider Gruppen sich wieder annäherte und keine signifikanten Unterschiede bis zum Versuchsende (Tag 59 nach Fütterungsbeginn) mehr vorlagen.

Dies wurde außerdem durch die Messung des finalen Körpergewichts bzw. der Tibiallänge kurz vor Organentnahme bestätigt, in der keine signifikanten Unterschiede zu beobachten waren (Abbildung 26). Das durchschnittliche Körpergewicht betrug $25,11 \pm 0,30$ g in der Kontrollgruppe und $25,41 \pm 0,22$ g in der 4-MU-Gruppe. Auffällig war hierbei, dass 59 Tage nach Fütterungsbeginn das ursprüngliche gemittelte Startgewicht von $28,27 \pm 0,43$ g (Kontrollgruppe) und $28,59 \pm 0,37$ g (4-MU-Gruppe) nicht wieder erreicht wurde. Die durchschnittliche Tibiallänge betrug $19,08 \pm 0,07$ mm in der Kontrollgruppe und $19,2 \pm 0,08$ mm in der 4-MU-Gruppe.

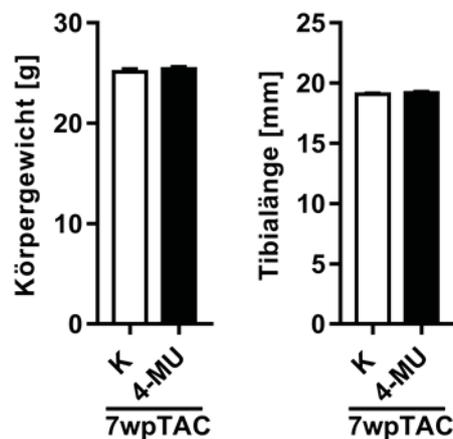


Abbildung 26: Finales Körpergewicht und Tibiallänge für den langen Nachbeobachtungszeitraum, 7 Wochen nach operativer Aortenstenose (7wpTAC). Verglichen wurden 4-Methylumbelliferon-behandelte Mäuse (4-MU) und unbehandelte Kontrollmäuse (K) bei Versuchsende. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; n = 13; t-Test.

Da die Mäuse nachweislich unter 4-MU-Behandlung einen Gewichtsverlust erlitten hatten, konnte ein Hungereffekt nicht ausgeschlossen werden. Somit stellte unser Fütterungsmodell eine potentielle Quelle für eine Verzerrung (Bias) dar (4.5). Das Körpergewicht bzw. die Tibiallänge wurde zudem zur Normalisierung des Herzgewichts verwendet, das maßgeblich den Hypertrophie-Grad bestimmt, und ist daher von weiterer Bedeutung.

3.3.3 Schätzung der Überlebensraten nach Kaplan-Meier

Um ein Gefahrenpotential ausgehend von der 4-MU-Behandlung im Rahmen unseres Hypertrophie-Modells auszuschließen, wurde die Überlebensrate aller Versuchstiere nach TAC-OP, also 3dpTAC und 7wpTAC, dokumentiert (Abbildung 27).

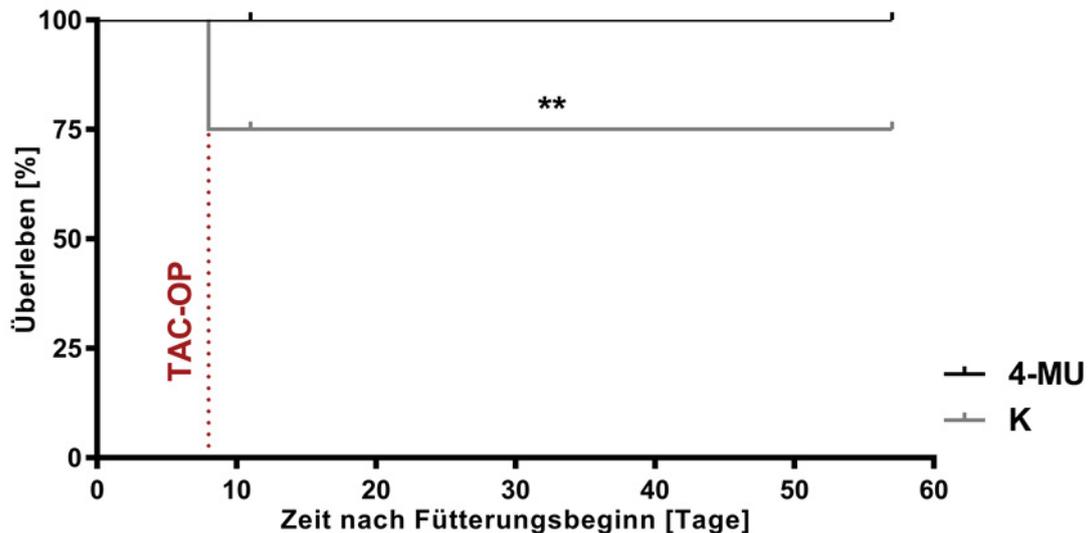


Abbildung 27: Kaplan-Meier Überlebenskurve von 4-Methylembelliferon-behandelten Mäusen (4-MU) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollmäusen (K) nach operativer Aortenstenose (TAC-OP). Die rote Linie markiert die TAC-OP am 8. Versuchstag. $n = 32 - 40$; *Log-Rank-Test*; $**p < 0,001$.

Garcia-Menendez *et al.* beschrieben, dass die TAC *per se* bereits ein Sterberisiko von etwa 20 % in C57BL/6 Mäusen ohne Behandlung birgt [107]. Übereinstimmend mit diesen Daten, zeigten die Kontrolltiere eine ähnlich hohe Mortalität von 25 % ($p = 0,0025$) bei einer Gruppengröße von 40 Mäusen. Davon sind 10 Mäuse bereits während oder kurz nach der TAC-OP gestorben.

Die 4-MU-behandelten Mäusen zeigten hingegen mit einer Gruppengröße von 32 Tieren eine signifikant verbesserte Überlebenswahrscheinlichkeit von 100 %. Ob dieser Effekt tatsächlich von der 4-MU-Behandlung oder anderen Faktoren abhängig ist, bleibt fraglich.

Demnach kann ein erhöhtes Gefahrenpotential hinsichtlich Sterberisikos für die 4-MU-Behandlung ausgeschlossen werden.

3.3.4 Untersuchung der Hyaluronsäure-Synthese im Herzen und im Blutplasma

Die Substanz 4-MU blockiert durch kompetitive Substrathemmung die HA-Synthese, was bereits in vielen verschiedenen Modellen, unter anderem auch für Herzkrankheiten, wie zum Beispiel für Atherosklerose, belegt wurde [108]. Um die Rolle von HA während des frühen myokardialen *Remodeling* nach TAC zu untersuchen, war es notwendig zu belegen, dass 4-MU auch in unserem Modell die Abundanz von HA im Herzgewebe senkt.

Wie bereits im Teil 3.1.5.1 gezeigt wurde, nimmt vor allem die mRNA-Expression von *Has2* 3 Tage nach TAC-OP stark zu. Nun wurde zusätzlich geprüft, ob eine Veränderung auf Produktebene der HA durch 4-MU-Behandlung detektierbar war. Da das Glykosaminoglykan HA selbst keine immunogene Struktur aufweist, ist eine Quantifizierung durch einen Antikörperbasierten Assay nicht möglich. In der Forschung gilt es als akzeptiert die HA-Menge indirekt über einen spezifischen Bindungspartner zu bestimmen, nämlich das HA-Bindeprotein (HABP). Somit erfolgte eine histologische Färbung vom Herzgewebe mittels biotinyliertem HABP für den Akutzeitraum, 3 Tage nach Schein- bzw. TAC-OP (Abbildung 28). Unter 4-MU-Behandlung war in beiden Gruppen ein Trend für eine verminderte HA-Akkumulation zu erkennen, bei der die jeweiligen Mittelwerte mehr als halbiert waren. Allerdings ist die Streuung beider Kontrollgruppen im Vergleich zu den 4-MU-Gruppen relativ hoch.

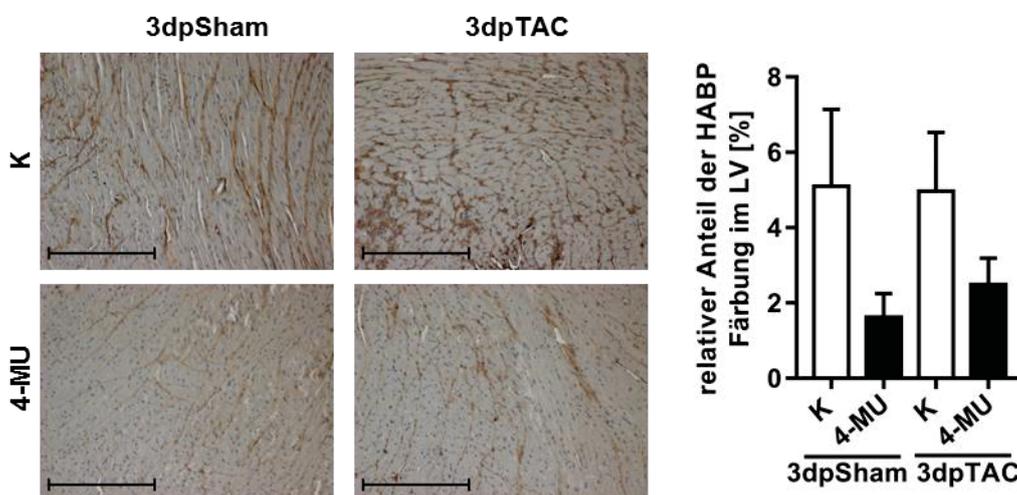


Abbildung 28: Hyaluronsäure-Synthese im Herzen 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC) bzw. nach Schein-Operation (3dpSham). Repräsentative Aufnahmen der HABP-Färbung von Paraffinherzschnitten aus dem linken Ventrikel der Gruppen 3dpSham und 3dpTAC nach 4-Methylumbelliferon-Behandlung (4-MU) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (K) (Maßstabsbalken entspricht 200 µm). Relative Quantifizierung der HABP-positiven braunen Fläche normiert auf die linksventrikuläre Gewebsfläche (LV). Dargestellt als prozentualer Anteil; Mittelwert ± SEM; n = 5 - 11; *one-way* ANOVA.

Ergebnisse

Eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung der HA-Menge bietet der HABP *Sandwich* ELISA-ähnliche Assay, der bereits bei den *in vitro*-Experimenten genutzt wurde (3.2.2). Da 4-MU nach oraler Aufnahme auch systemisch verfügbar ist, wurde nun ein systemischer Effekt von 4-MU durch Bestimmung der HA-Menge im Blutplasma untersucht (Abbildung 29).

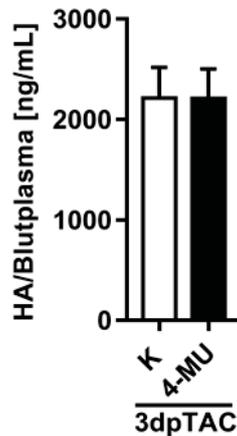


Abbildung 29: Plasmakonzentrationsbestimmung von Hyaluronsäure (HA) 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC). Messung erfolgte in Mäusen nach 4-Methylumbelliferon-Behandlung (4-MU) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (K) mittels HA-Bindeprotein *Sandwich* ELISA-ähnlichem Assay und wurde auf die Blutplasmamenge normiert. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; $n = 8$; t -Test.

Hier waren jedoch keine Veränderungen hinsichtlich der HA-Menge zu beobachten. Es gibt Hinweise, dass 4-MU auch eine inhibitorische Wirkung auf die Genexpression ausübt, unter anderem auch auf *Has2-3* [89]. Der zugrundeliegende Mechanismus ist allerdings noch nicht bekannt. Aus diesem Grund wurde die Genexpression von *Has2-3* zu beiden Zeiträumen, 3 Tage und 7 Wochen nach Schein- bzw. TAC-OP, mittels qPCR gemessen (Abbildung 30).

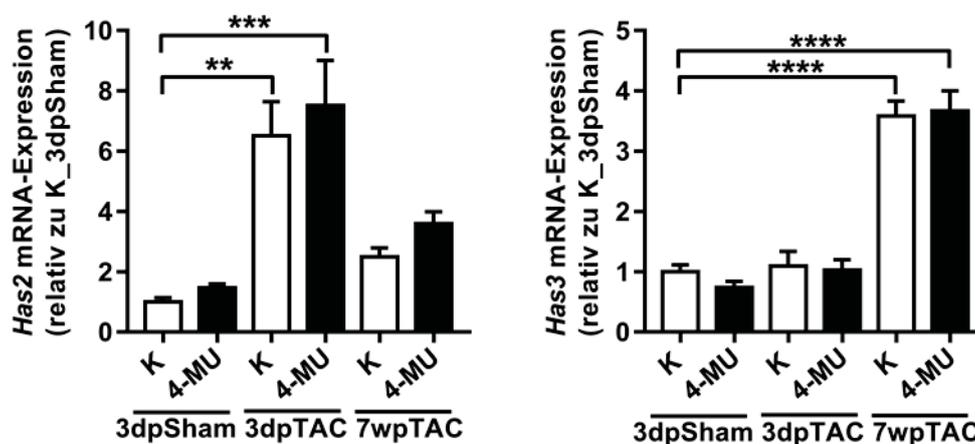


Abbildung 30: Kardiale mRNA-Expression von *Has2* und *Has3* 3 Tage sowie 7 Wochen nach operativer Aortenstenose (3dpTAC, 7wpTAC) bzw. nach Schein-Operation (3dpSham). Messung erfolgte in Mäusen nach 4-Methylumbelliferon-Behandlung (4-MU) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (K) mittels qPCR. Als Referenzgen wurde *Gapdh* verwendet. Dargestellt als Vielfaches der Kontrolle (hier: K_3dpSham); Mittelwert \pm SEM; $n = 5 - 13$; *one-way* ANOVA; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$; **** $p < 0,0001$ gegen Kontrolle.

Ergebnisse

Allerdings wurden für keine der drei *Has*-Isoenzyme Veränderungen der Genexpression nach 4-MU-Behandlung im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe beobachtet. Eine Hochregulation der *Has2* war nur für den Akutzeitraum, 3 Tage nach TAC-OP, evident. Interessanterweise war die *Has3*-Expression 7 Wochen nach TAC-OP in beiden Gruppen mehr als verdreifacht. Die *Has3* stellt mit 71,3 % die Hauptisoform im gesunden Herzen dar (3.1.3). Die *Has1* mRNA-Expression war weder 3 Tage noch 7 Wochen nach TAC-OP verändert (Appendix, Abbildung 45).

Um den Befund der hohen *Has3*-Expression 7 Wochen nach TAC-OP besser bewerten und einordnen zu können, wurde eine histologische Färbung mittels biotinyliertem HABP durchgeführt. Diese ergab, dass beide Gruppen eine relative hohe Abundanz von HA aufzeigten. Jedoch war nach 4-MU-Behandlung keine inhibitorische Wirkung mehr auf die HA-Synthese nachweisbar.

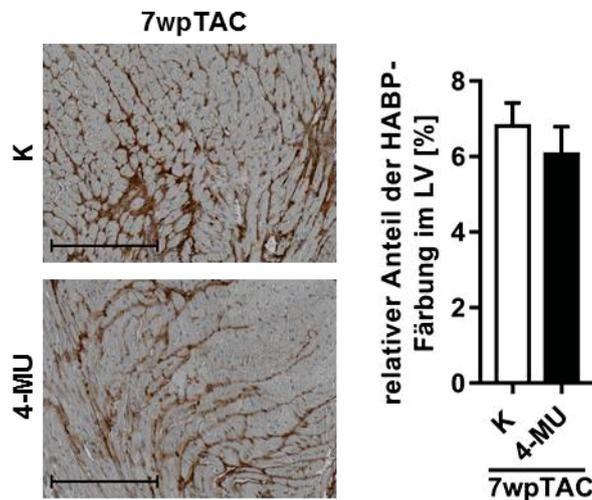


Abbildung 31: Hyaluronsäure-Synthese im Herzen 7 Wochen nach operativer Aortenstenose (7wpTAC). Repräsentative Aufnahmen der HABP-Färbung von Paraffinherzschnitten aus dem linken Ventrikel nach 4-Methylumbelliferon-Behandlung (4-MU) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (K) (Maßstabsbalken entspricht 200 µm). Relative Quantifizierung der Hyaluronsäure-Bindeprotein (HABP)-positiven braunen Fläche normiert auf die linksventrikuläre Gewebsfläche (LV). Dargestellt als prozentualer Anteil; Mittelwert ± SEM; n = 13; *t*-Test.

Durch den indirekten HA-Nachweis mittels HABP wurde nicht eindeutig belegt werden, dass 4-MU die HA-Akkumulation blockiert, jedoch war ein starker Trend hinsichtlich erniedrigter HA-Akkumulation 3 Tage nach TAC-OP unter 4-MU-Behandlung erkennbar. In der Fachliteratur liegt gesichert vor, dass 4-MU die HA-Synthese in vielen verschiedenen Zell- sowie Tiermodell blockiert [86, 87, 89, 108-113].

3.3.5 Analyse der Herzfunktion

Eine myokardiale Hypertrophie ist durch eine verdickte Herzwand und eine Funktionseinschränkung des Herzens gekennzeichnet. Daher wurde mittels Echokardiographie die Herzfunktion nach 4-MU-Behandlung basal (BL), 2 Wochen (2wpTAC) sowie 7 Wochen nach TAC-OP (7wpTAC) analysiert und mit Kontrollmäusen verglichen. Neben den morphologischen Veränderungen des Herzens *in vivo*, war auch die systolische Herzfunktion von besonderem Interesse.

Als Parameter für die globale systolische Funktion dient die Verkürzungsfraktion (englisch: *fractional shortening*, FS), die auf Grundlage des diastolischen und systolischen linksventrikulären Durchmessers (englisch: *systolic and diastolic left-ventricular internal diameter*, LVID;s und LVID;d) die relative Verkürzung der Herzkammern während der Systole wiedergibt (Abbildung 32 A). Der systolische und diastolische linksventrikuläre Durchmesser waren basal in beiden Behandlungsgruppen nicht unterschiedlich. Zwei und 7 Wochen nach TAC-OP erhöhte sich der systolische Innendurchmesser, während der diastolische Innendurchmesser zu den drei Messzeitpunkten etwa gleichbleibend war (Abbildung 32 B). Dies wurde in beiden Behandlungsgruppen beobachtet und deutet auf eine verschlechterte linksventrikuläre Kontraktilität hin. Allerdings war die Abnahme der Kontraktilität bei den 4-MU-behandelten Mäusen geringer, da sie 2 Wochen nach TAC-OP einen signifikant erniedrigten systolischen linksventrikulären Durchmesser ($2,828 \pm 0,0771$ mm; $p = 0,0051$) im Vergleich zu Kontrollmäusen ($3,135 \pm 0,06042$ mm) aufzeigten (Abbildung 32 C). Sieben Wochen nach TAC-OP ist dieser Unterschied nicht mehr signifikant. Entsprechend war die Verkürzungsfraktion in den 4-MU-behandelten Mäusen 2 Wochen nach TAC-OP mit $29,24 \pm 1,48$ % signifikant erhöht ($p = 0,0005$) im Vergleich zu den Kontrollmäusen mit $21,35 \pm 1,28$ % (Abbildung 32 D). Auch in diesem Fall war 7 Wochen nach TAC-OP kein 4-MU-Effekt auf die Verkürzungsfraktion erkennbar. Darüber hinaus diente auch das Geschwindigkeitszeit-Integral (englisch: *velocity time integral*, VTI), das mittels Doppler-Ultraschalluntersuchung bestimmt wurde und die zeitabhängige Blutflussgeschwindigkeit im aortalen Ausflusstrakt wiedergibt, zur Berechnung des linksventrikulären Schlagvolumens und somit als Parameter für die Herzfunktion. Hier waren basal keine Unterschiede zwischen beiden Behandlungsgruppen zu beobachten, allerdings war 2 und 7 Wochen nach TAC-OP das Geschwindigkeitszeit-Integral (Kontrolle^{2wpTAC}: $41,68 \pm 1,45$ mm; 4-MU^{2wpTAC}: $51,86 \pm 1,50$ mm; Kontrolle^{7wpTAC}: $43,73 \pm 2,45$ mm; 4-MU^{7wpTAC}: $51,90 \pm 2,52$ mm;) in den 4-MU-behandelten Mäusen signifikant erhöht ($p^{2wpTAC} < 0,0001$; $p^{7wpTAC} = 0,0308$) (Abbildung 32 E).

Ergebnisse

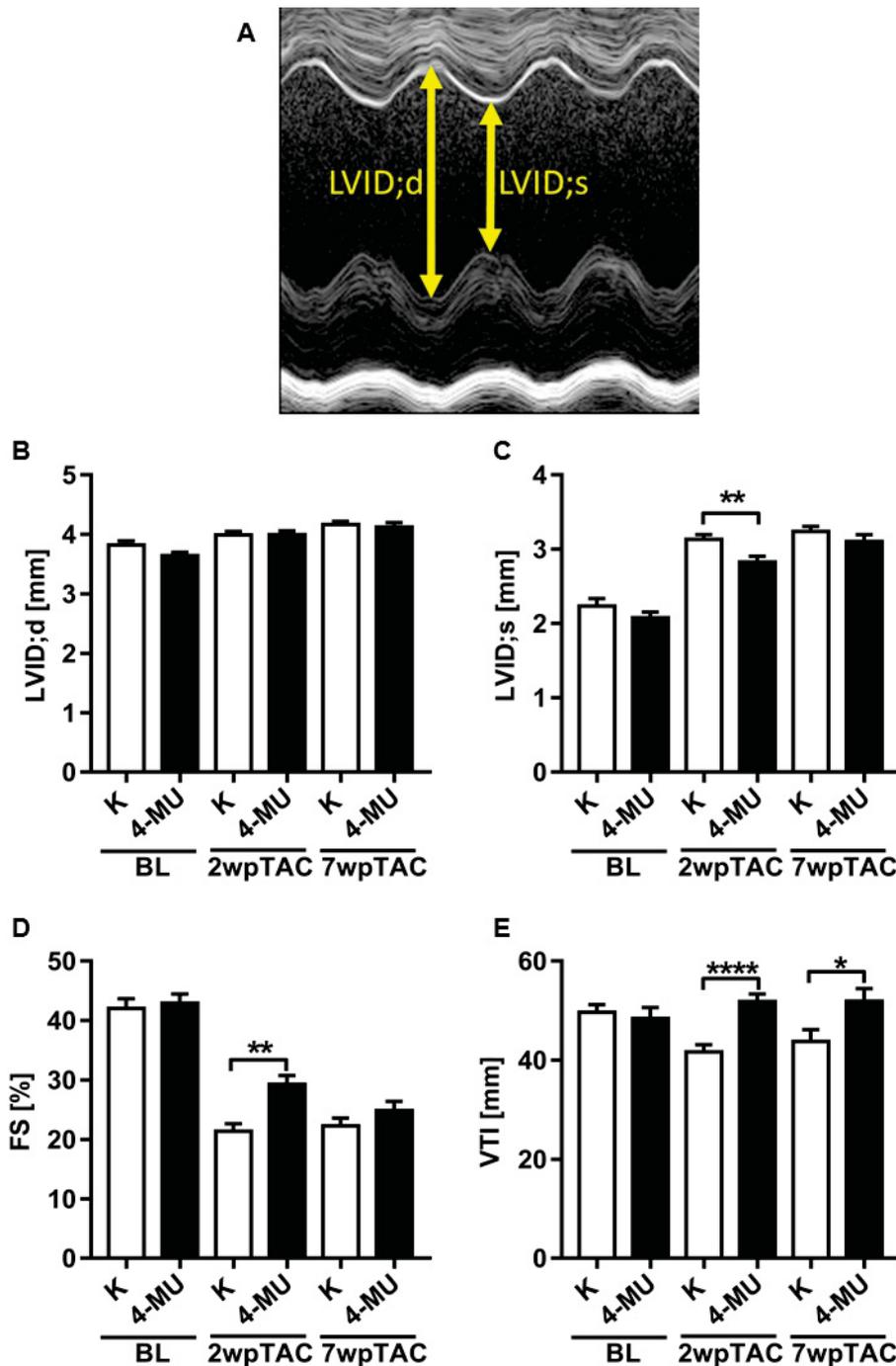


Abbildung 32: Herzfunktionsanalyse mittels Echokardiographie basal (BL), 2 Wochen sowie 7 Wochen nach operativer Aortenstenose (2wpTAC, 7wpTAC). Vergleich von 4-Methylumbelliferone-behandelten Mäusen (4-MU) und unbehandelten Kontrollmäusen (K). Repräsentative Darstellung zur Messung des diastolischen und systolische Innendurchmesser des linken Ventrikels (LVID;d, LVID;s) im parasternalen Kurzachsenschnitt (A). Aufgeführt sind die Quantifizierungen zum systolischen (LVID;s in mm) (B) und diastolischen Innendurchmesser des linken Ventrikels (LVID;d in mm) (C), die Verkürzungsfraction (FS in %) (D) und das Geschwindigkeitszeit-Integral (VTI in mm) (E). Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; n = 13 - 15; t-Test; *p < 0,05; **p < 0,01; **p < 0,0001 gegen jeweilige Kontrolle.**

Ergebnisse

Anhand der echokardiografischen Messungen ist auch eine Charakterisierung der Herzmorphologie möglich. Dabei wurden in diesem Kontext die Parameter der berechneten linksventrikulären Herzmuskelmasse (englisch: *calculated left ventricular mass, calc. LV mass*) und die interventrikulären Wandstärke (IVS) sowie die Hinterwanddicke (englisch: *posterior wall thickness, PWT*) abgeleitet.

Zwei Wochen nach TAC-OP war die berechnete linksventrikuläre Herzmuskelmasse in der 4-MU-Gruppe ($125,0 \pm 3,00$ mg) signifikant erniedrigt ($p = 0,0220$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($138,4 \pm 3,67$ mg). Ein Trend war 7 Wochen nach TAC-OP (Kontrolle: $160,7 \pm 3,70$ mg; 4-MU: $152,9 \pm 4,60$ mg; $p = 0,2095$) noch stets erkennbar.

Ähnlich dazu war 2 Wochen nach TAC-OP ein starker Trend zu dünneren Wanddicken in der 4-MU-Gruppe hinsichtlich der diastolischen interventrikulären Septumsdicke (Kontrolle: $0,92 \pm 0,07$ mm; 4-MU: $0,85 \pm 0,11$ mm; $p = 0,0904$) und der diastolischen Hinterwanddicke (Kontrolle: $0,89 \pm 0,10$ mm; 4-MU: $0,82 \pm 0,10$ mm; $p = 0,0649$) deutlich.

Eine Zusammenstellung der Messdaten, die durch die echokardiographische Untersuchung erhoben wurden, findet sich in Tabelle 11.

Summa summarum wurde ein begünstigender 4-MU-Effekt hinsichtlich systolischer Herzfunktion beobachtet. Zudem waren die Herzdimensionen nach TAC-OP und 4-MU-Behandlung bezüglich berechneter linksventrikulärer Herzmuskelmasse und Wanddicken im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert. Diese Effekte waren 2 Wochen nach TAC-OP besonders deutlich ausgeprägt.

Ergebnisse

Tabelle 11: Echokardiographische Parameter basal (BL), 2 Wochen sowie 7 Wochen nach operativer Aortenstenose (2wpTAC, 7wpTAC). Vergleich von 4-Methylumbelliferon-behandelten Mäusen (4-MU) und unbehandelten Kontrollmäusen (K). Aufgeführt sind die jeweiligen Gruppengrößen (n), die Ejektionsfraktion (EF in %), die Verkürzungsfraktion (FS in %), das Geschwindigkeitszeit Integral (VTI in mm), die diastolische und systolische interventrikuläre Wandstärke (IVSd und IVSs in mm), der diastolische und systolische Innendurchmesser des linken Ventrikels (LVIDd und LVIDs in mm), die diastolische und systolische Hinterwanddicke (PWTd und PWTs in mm) und die berechnete Herzmuskelmasse des linken Ventrikels (*calc. LV mass* in mg). Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; n = 13 - 15; t-Test; *p < 0,05 gegen jeweilige Kontrolle.

	Kontrolle			4-MU		
	BL	2wpTAC	7wpTAC	BL	2wpTAC	7wpTAC
n	15	13	13	15	15	15
EF [%]	73,1 \pm 8,9	43,6 \pm 9,0	45,6 \pm 8,8	73,9 \pm 7,6	54,7 \pm 11,0 *	50,4 \pm 10,4
FS [%]	42,0 \pm 6,8	21,4 \pm 5,2	22,7 \pm 5,1	42,6 \pm 6,8	28,4 \pm 6,8 *	25,7 \pm 6,4
VTI [mm]	49,7 \pm 6,0	41,7 \pm 5,2	43,7 \pm 8,5	48,4 \pm 8,5	51,9 \pm 5,8 *	51,9 \pm 9,8 *
IVSd [mm]	0,70 \pm 0,08	0,92 \pm 0,07	0,96 \pm 0,07	0,69 \pm 0,04	0,85 \pm 0,11	0,92 \pm 0,09
IVSs [mm]	1,13 \pm 0,13	1,15 \pm 0,10	1,16 \pm 0,08	1,10 \pm 0,16	1,13 \pm 0,16	1,22 \pm 0,15
LVIDd [mm]	3,82 \pm 0,26	3,99 \pm 0,22	4,17 \pm 0,19	3,64 \pm 0,23	3,99 \pm 0,25	4,12 \pm 0,29
LVIDs [mm]	2,23 \pm 0,40	3,14 \pm 0,22	3,24 \pm 0,25	2,08 \pm 0,28	2,83 \pm 0,30 *	3,10 \pm 0,37
PWTd [mm]	0,64 \pm 0,08	0,89 \pm 0,10	0,95 \pm 0,08	0,64 \pm 0,07	0,82 \pm 0,10	0,94 \pm 0,07
PWTs [mm]	1,10 \pm 0,12	1,07 \pm 0,09	1,21 \pm 0,09	1,10 \pm 0,12	1,14 \pm 0,19	1,23 \pm 0,22
calc. LV mass [mg]	85,2 \pm 13,8	138,4 \pm 13,2	160,7 \pm 13,3	79,6 \pm 13,2	125 \pm 15,5 *	152,9 \pm 17,8

3.3.6 Untersuchung von Hypertrophie-Markern

Das kardiale *Remodeling* nach TAC und anderen Hypertrophie-Stimuli ist initial durch eine erhöhte Apoptose von Kardiomyozyten charakterisiert, die durch eine verstärkte Fibrose (englisch: *replacement fibrosis*) teilweise kompensiert wird [48]. Durch Aktivierung intrazellulärer Signalwege wird in Kardiomyozyten eine hypertrophische Zellantwort ausgelöst um dem mechanischen Stress entgegenzuwirken. Eine Beteiligung vieler verschiedener Signalkaskaden wurde bereits beschrieben, unter anderen spielt auch die MAPK-Kaskade eine wichtige Rolle während des hypertrophischen *Remodeling* [10, 114].

Im vorangegangenen *in vitro*-Experiment (3.2.1) wurden bereits Hinweise hinsichtlich eines Hypertrophie-hemmenden Effekts von 4-MU in H9C2-Myoblasten gewonnen. Nun wurde geprüft, ob auch im komplexen Organismus im Rahmen unseres Hypertrophie-Modells ein ähnlicher 4-MU-Effekt zu beobachten war (Abbildung 33).

Dafür wurde zunächst die globale Hypertrophie 7 Wochen nach TAC-OP betrachtet. Zu diesem Zeitpunkt ist der Hypertrophie-Phänotyp in den Mäusen nach TAC bereits manifestiert. Diese war durch Erhöhung des Herzgewichts sowie verstärkte Expression von genetischen Markern für Hypertrophie gekennzeichnet. Das Feuchtherzgewicht war in den 4-MU-behandelten Tieren mit einem Mittelwert von $162,1 \pm 5,87$ mg signifikant leichter ($p = 0,0064$) als das der Kontrolltiere ($190,9 \pm 7,63$ mg). Im Vergleich dazu, wies das durchschnittliche Feuchtherzgewicht der scheinoperierten Kontrollgruppe (3dpSham), bei der keine Hypertrophie-Ausbildung zu erwarten wäre, einen Wert von $106,1 \pm 5,19$ mg auf (Appendix, Abbildung 46). Zudem wurde das Trockengewicht nach Gefriertrocknung dokumentiert, um auszuschließen, dass der Gewichtsverlust durch verminderte Wassereinlagerungen bedingt war, denn 4-MU inhibiert die Synthese von HA, die als EZM-Bestandteil eine hohe Wasserbindungskapazität (1000-fach) besitzt [59]. Auch das Trockenherzgewicht der 4-MU-behandelten Mäuse (Kontrolle: $46,75 \pm 1,54$ mg; 4-MU: $38,99 \pm 1,29$ mg) war signifikant erniedrigt ($p = 0,0008$), somit lag dem verminderten Herzgewicht keine verminderte Wasserretention zugrunde. Ebenso war das Feuchtherzgewicht normalisiert auf das Körpergewicht (Kontrolle: $7,58 \pm 0,29$ mg/g; 4-MU: $6,38 \pm 0,20$ mg/g; $p = 0,0023$) und die Tibialänge (Kontrolle: $10,00 \pm 0,40$ mg/g; 4-MU: $8,45 \pm 0,30$ mg/g; $p = 0,0048$) signifikant erniedrigt (Abbildung 33 A).

Ergebnisse

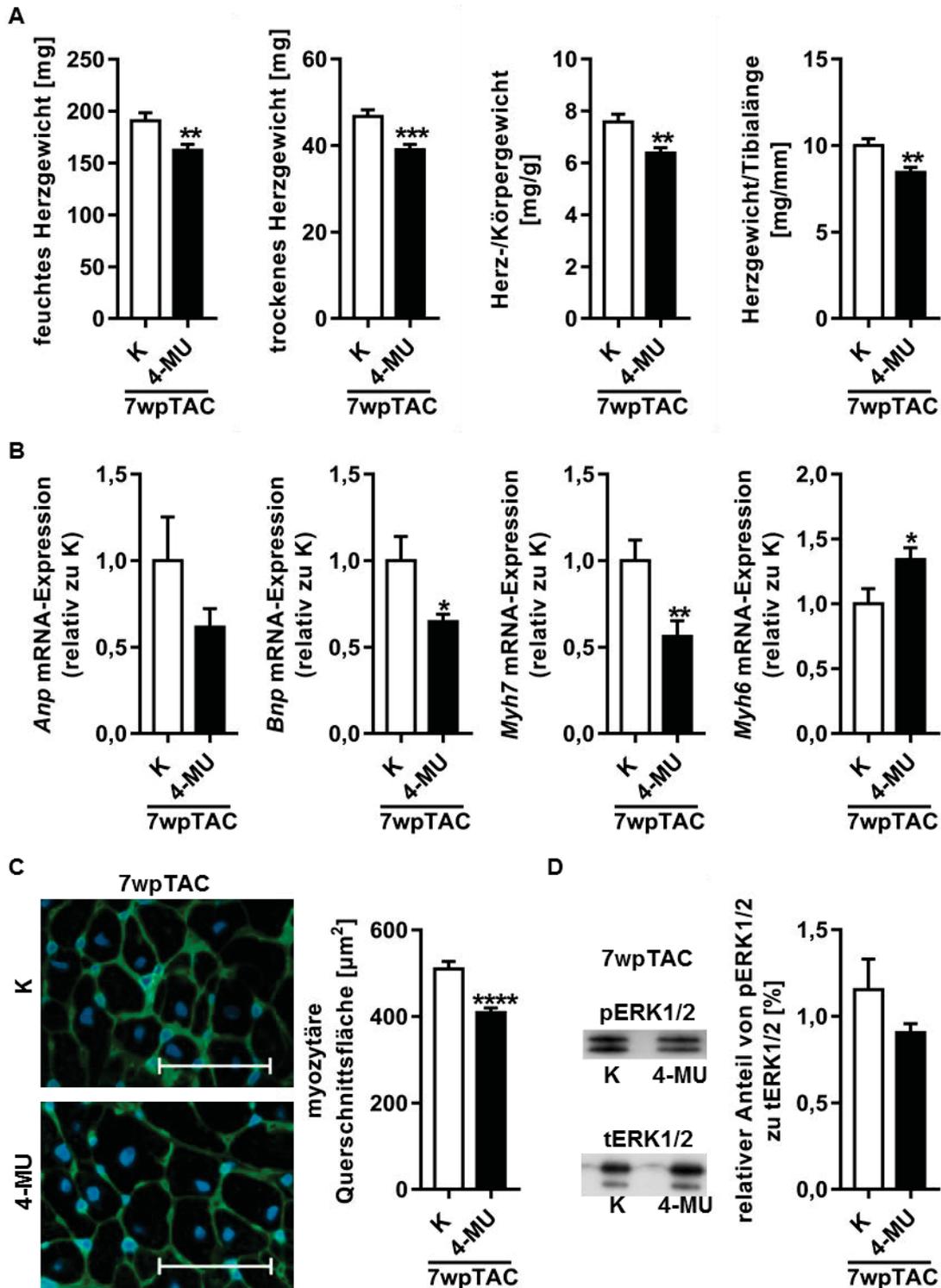


Abbildung 33 Kardiale Hypertrophie 7 Wochen nach operativer Aortenstenose (7wpTAC). Vergleich von 4-Methylumbelliferon-behandelten Mäusen (4-MU) und unbehandelten Kontrollmäusen (K). Dargestellt sind das Feuchtherzgewicht, das Trockenherzgewicht, das Verhältnis von Körpergewicht-zu-Feuchtherzgewicht und das von Tibiallänge-zu-Feuchtherzgewicht (A). Messung der Expressionsstärke der genetischen Marker für Hypertrophie *Anp*, *Bnp*, *Myh7* und *Myh6* mittels qPCR. Als Referenzgen wurde *Gapdh* verwendet (B). Repräsentative Aufnahmen der *Wheat Germ Agglutinin* (WGA)- und DAPI-Färbung von Paraffinherzschnitten aus dem linken Ventrikel (Maßstabsbalken entspricht 50 μm). Absolute Quantifizierung der Einzelzellgrößen (in μm^2) von Kardiomyozyten (C). Repräsentativer *Western Blot* von phosphorylierten (pERK1/2) und totalen ERK1/2 (tERK1/2) sowie Quantifizierung der relativen Anteile (D). Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; n = 13; t-Test; *p < 0,05; **p < 0,001; ***p < 0,0001; ****p < 0,0001.

Ergebnisse

Weiterhin wurde die mRNA-Expression von genetischen Hypertrophie-Markern untersucht, die für das atriale natriuretische Peptid (*Anp*), das natriuretische Peptid Typ B (*Bnp*), die α -Isoform (*Myh6*) sowie die β -Isoform des kardialen Myosins (*Myh7*) kodieren. Im linken Ventrikel von 4-MU-behandelten Mäusen war die mRNA-Expression von *Anp* (Kontrolle: $1 \pm 0,25$; 4-MU: $0,62 \pm 0,11$; $p = 0,1737$) trendmäßig und die von *Bnp* (Kontrolle: $1 \pm 0,14$; 4-MU: $0,65 \pm 0,04$; $p = 0,0238$) sowie *Myh7* (Kontrolle: $1 \pm 0,12$; 4-MU: $0,56 \pm 0,09$; $p = 0,0078$) signifikant erniedrigt vor, wohingegen die von *Myh6* (Kontrolle: $1 \pm 0,12$; 4-MU: $1,34 \pm 0,09$; $p = 0,0302$) im Vergleich zu Kontrollmäusen signifikant erhöht vorlag. Die Expression von *Myh6* korreliert im Gegensatz zu *Anp*, *Bnp* und *Myh7* negativ mit dem beobachteten Hypertrophie-Grad [115] Es ist bekannt, dass im Rahmen einer kardialen Hypertrophie ein Isoformenwechsel (englisch: *Isoform Switching*) von *Myh6* zu *Myh7* stattfindet (Abbildung 33 B). Die mittels qPCR erhobenen Daten sprechen also ebenfalls für eine Reduktion der Hypertrophie-Antwort in den 4-MU-behandelten Mäusen.

Da sich die myokardiale Hypertrophie über das Wachstum der Herzmuskelzellen definiert, wurde eine Bestimmung der Einzelzellgrößen durchgeführt, die an histologischen Herzschnitten mittels WGA-Färbung visualisiert und gemessen worden sind. Die Kardiomyozyten der 4-MU-behandelten Mäuse waren mit einer durchschnittlichen Querschnittsfläche von $409,2 \pm 10,9 \mu\text{m}^2$ signifikant kleiner als die der Kontrolltiere mit $510,2 \pm 17,3 \mu\text{m}^2$ ($p = <0,0001$) (Abbildung 33 C).

Mechanistisch wurde auch die Phosphorylierung, also Aktivierung, von *Extracellular-signal Regulated Kinases* 1 und 2 (ERK1 und ERK2) untersucht. Diese werden als Effektorinasen nach Aktivierung der MAPK-Kaskade, die als wichtiger Signaltransduktor während der myokardialen Hypertrophie gilt, phosphoryliert. Allerdings wurde mittels *Western Blot* keine signifikant veränderte Phosphorylierung von ERK1/2 (pERK1/2) im Verhältnis zum totalen ERK1/2 (tERK1/2) 7 Wochen nach TAC-OP beobachtet. Ein Trend hinsichtlich weniger Phosphorylierung von ERK1/2 im Herzen von 4-MU-behandelten Mäusen war erkennbar ($p = 0,1871$) (Abbildung 33 D). Gleiches gilt für den Akutzeitraum, 3 Tage nach TAC-OP ($p = 0,2014$) (Appendix, Abbildung 47).

Zusammenfassend deuten die hier erhobenen Daten auf eine deutlich reduzierte Hypertrophie-Antwort 7 Wochen nach TAC-OP in den 4-MU-behandelten Mäusen hin. Insbesondere das geringere Herzgewicht, die erniedrigte Expression von *Bnp* sowie *Myh7*, die erhöhte Expression von *Myh6* und die kleinere Einzelzellgröße der Kardiomyozyten waren in diesem Zusammenhang bedeutsam.

3.3.7 Quantifizierung der interstitiellen und perivaskulären Fibrose

Das kardiale *Remodeling* nach Hypertrophie-Stimulation ist unter anderem durch eine schwere Fibrosierung des Herzgewebes charakterisiert [48]. Es ist eine kompensatorische Maßnahme, die dem Herzen nach dem Zelluntergang der Kardiomyozyten (*replacement fibrosis*) wieder Stabilität verleiht. Allerdings ist bei starker Ausprägung die elektrische Reizüberleitung der Kardiomyozyten gestört, die schließlich auch in Herzrhythmusstörungen münden kann [116].

Bei der kardialen Fibrose unterscheidet man abhängig von der Lokalisation zwischen zwei Formen, und zwar zwischen interstitiell, gemeint ist damit der Extrazellularraum im Bindegewebe, und perivaskulär, also der unmittelbar angrenzende Bereich um die Gefäßwände. Zur Messung der interstitiellen Fibrose nach Picro-Sirius-Rot-Färbung wurde lediglich der linke Ventrikel berücksichtigt; größere Gefäße sowie Artefakte, hervorgerufen durch das Schneide- oder Färbeprozedere (beispielsweise aufgefaltetes Gewebe), wurden von der Quantifizierung ausgeschlossen. Hier zeigte sich eindeutig eine Reduktion des fibrotischen Gewebes von durchschnittlich $1,94 \pm 0,31$ % auf $0,93 \pm 0,11$ % ($p = 0,0050$) in den 4-MU-behandelten Mäusen 7 Wochen nach TAC-OP (Abbildung 34 A).

In Übereinstimmung mit diesen Daten wurde zudem eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression von Vimentin (*Vim*) im Herzgewebe des linken Ventrikels nach 4-MU-Behandlung (Kontrolle: $1 \pm 0,12$; 4-MU: $0,70 \pm 0,06$; $p = 0,0389$) 7 Wochen nach TAC-OP gezeigt (Abbildung 34 B). Vimentin wird im Herzen hauptsächlich von Fibroblasten exprimiert, aber auch andere Nicht-Kardiomyozyten sind für diesen Marker positiv.

Es wurden noch weitere genetische Marker für kardiale Fibrose mittels qPCR untersucht. Hier zeigten sich allerdings 7 Wochen nach TAC-OP keine signifikanten Unterschiede für die Genexpression der Kollagene *Col1a1* und *Col3a1*. Ebenso war keine Veränderung für alpha-Smooth Muscle Actin (*α -Sma*) und der Matrix Metalloproteinase 2 (*Mmp2*) nachweisbar. Darüber hinaus wurde eine Genexpressionsanalyse von Fibronectin (*Fn1*), Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3 (*Timp3*) und Tenascin-C (*Tn-c*) 7 Wochen nach TAC-OP durchgeführt, aber auch hier keine signifikanten Unterschiede vorhanden (Appendix, Abbildung 48).

Zur Schätzung der perivaskulären Fibrose wurden von jedem Versuchstier ein Herzschnitt untersucht und jeweils drei orthogonal angeschnittene arterielle Gefäße im linken Ventrikel für die Quantifizierung ausgewählt. Die angrenzende Fibrose wurde auf die Gefäßgröße normalisiert. Als Maß für die Gefäßgröße diente die Mediafläche. Hierbei wurde eine signifikante Reduzierung der perivaskulären Fibrose von durchschnittlich $3,08 \pm 0,32$ % auf $1,86 \pm 0,28$ % ($p = 0,0086$) in den 4-MU-behandelten Mäusen 7 Wochen nach TAC-OP gezeigt (Abbildung 34 C). In beiden Gruppen wurden arterielle Gefäße ähnlicher Größe betrachtet (Abbildung 34 D).

Ergebnisse

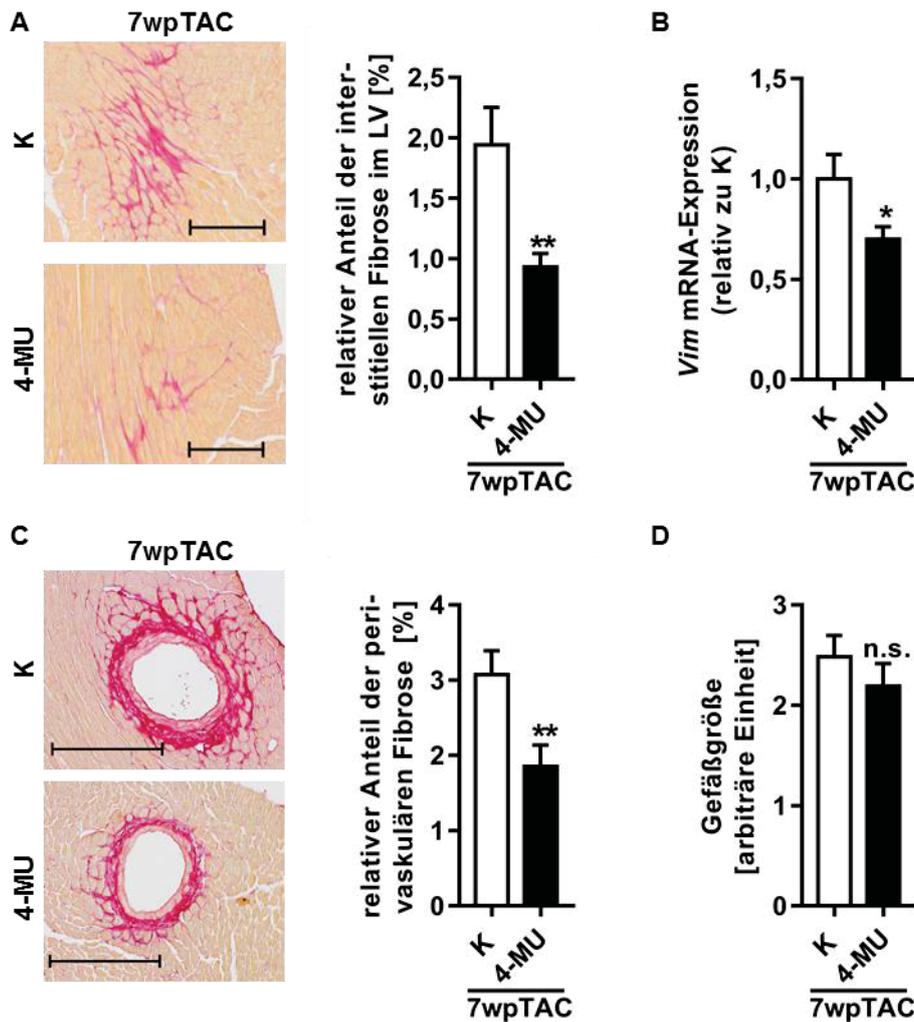


Abbildung 34: Kardiale Fibrose 7 Wochen nach operativer Aortenstenose (7wpTAC). Vergleich von 4-Methylumbelliferon-behandelten Mäusen (4-MU) und unbehandelten Kontrollmäusen (K). Repräsentative Aufnahmen der interstitiellen Fibrose von Paraffinherzschnitten aus dem linken Ventrikel mittels Picro-Sirius-Rot-Färbung (Maßstabsbalken entspricht 200 µm). Relative Quantifizierung der rot-gefärbten Fläche normiert auf die linksventrikuläre Gewebsfläche (LV) (A). Messung der Expressionsstärke von Vimentin (*Vim*) mittels qPCR. Als Referenzgen wurde *Gapdh* verwendet (B). Repräsentative Aufnahmen der perivaskulären Fibrose von Paraffinherzschnitten aus dem linken Ventrikel mittels Picro-Sirius-Rot-Färbung (Maßstabsbalken entspricht 200 µm). Relative Quantifizierung der rot-gefärbten Fläche normiert auf die Mediafläche des arteriellen Gefäßes (C). Zur Bestimmung der Gefäßgröße wurde die Mediafläche von drei orthogonal angeschnittenen arteriellen gemessen und gemittelt (D). Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; $n = 13$; t -Test; n. s. (nicht signifikant) $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

Zusammenfassend wurde eine 4-MU-vermittelte Reduktion der interstitiellen und perivaskulären Fibrose 7 Wochen nach TAC-OP beobachtet. Dieser Befund wurde zudem durch eine erniedrigte mRNA-Expression von Vimentin bestärkt.

3.3.8 Untersuchung der Entzündungsreaktionen nach operativer Aortenstenose

Es ist bekannt, dass im Rahmen einer kardialen Hypertrophie die Entwicklung einer Fibrose insbesondere durch inflammatorische Prozesse beeinflusst wird. Auch ein Einfluss auf die Ausbildung einer Hypertrophie wird diskutiert [117]. Darüber hinaus ist 4-MU als immunmodulatorische Substanz in der Literatur beschrieben [108]. Aus diesen Gründen wurden weitere Untersuchungen hinsichtlich des immunologischen Profils im hier untersuchten Hypertrophie-Modell durchgeführt.

Dabei wurden zunächst Genexpressionsanalysen von Entzündungsmarkern im Herzen nach Schein- und TAC-OP untersucht (3.3.8.1). Darüber hinaus erfolgte eine immunhistochemische Mac-2-Färbung des Herzens zur Quantifizierung der Makrophagen-Infiltration nach 4-MU-Behandlung (3.3.8.2). Letztlich wurde das Blut als Reservoir für zirkulierende Immunzellen und das Herz als primärer Entzündungsort durchflusszytometrisch analysiert (3.3.8.4, 3.3.8.3). In Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Grandoch und Dr. Homann vom Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf wurden die durchflusszytometrischen Daten erhoben.

3.3.8.1 Genexpressionsanalysen von Entzündungsmarkern im Herzen

Eine Genexpressionsanalyse von Zyto- und Chemokinen sowie der entsprechenden Rezeptoren, die in Verbindung mit Inflammationsprozessen im Herzen als etabliert gelten, wurde mittels qPCR durchgeführt. Hier zu nennen sind die Liganden CC-Chemokinligand 2 (*Ccl2*), CC-Chemokinligand 5 (*Ccl5*), CX3C-Chemokinligand 1 (*Cx3cl1*), CXC-Chemokinligand 1 (*Cxcl1*) und Interleukin1- β (*IL-1\beta*), (Abbildung 35 A) sowie die Rezeptoren CC-Chemokinrezeptor 2 (*Ccr2*), CC-Chemokinrezeptor 5 (*Ccr5*) und CX3C-Chemokinrezeptor 1 (*Cx3cr1*) (Abbildung 35 B).

Die dabei erhobenen Daten zeigten eine signifikant erhöhte Genexpression von *Ccr2*, *Ccr5* und *Cxcl1* sowie eine tendenziell erhöhte Genexpression von *Cx3cl1*, *Cx3cr1* und *Ccl2* für den Akutzeitraum, 3 Tage nach TAC-OP im Vergleich zu schein-operierten Tieren ohne 4-MU-Behandlung. Somit wurden weitere Hinweise dafür gesammelt, dass nach Hypertrophie-Stimulation Entzündungsprozesse von hoher Bedeutung sein könnten. Durch den Vergleich schein-operierter Mäuse wurde ausgeschlossen, dass diese Beobachtungen durch ein Operationstrauma verursacht wurden.

Ergebnisse

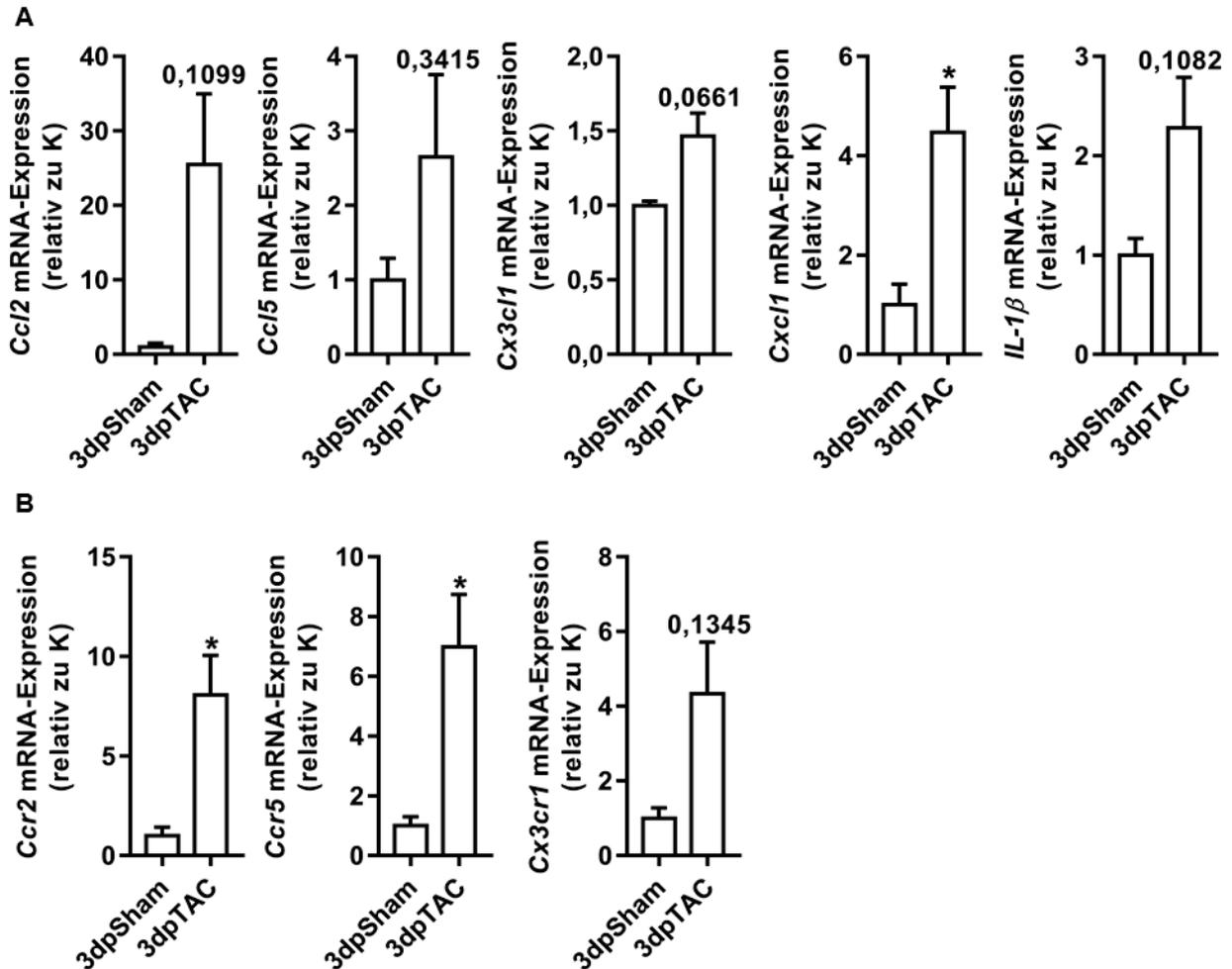


Abbildung 35: Kardiale mRNA-Expression von Entzündungsmarkern 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC) bzw. nach Schein-Operation (3dpSham). Messung der Expressionsstärke der Liganden *Ccl2*, *Ccl5*, *Cx3cl1*, *Cxcl1* und *IL-1β* (A) sowie der Rezeptoren *Ccr2*, *Ccr5* und *Cxcr1* (B) mittels qPCR. Als Referenzgen wurde *Gapdh* verwendet. Dargestellt als Vielfaches der Kontrolle (K, hier: 3dpSham); Mittelwert \pm SEM; n = 5 - 11; t-Test; *p < 0,05 oder mit jeweiligem P-Wert vermerkt.

Die 4-MU-Behandlung zeigte im Vergleich zur unbehandelten Gruppe keine Veränderungen in den Expressionsstärken der untersuchten Entzündungsmarker 3 Tage nach TAC-OP (Appendix, Abbildung 49). Im Gegensatz dazu waren eine Reihe der hier untersuchten Gene für den langen Nachbeobachtungszeitraum, 7 Wochen nach TAC-OP, verändert. So lag die Expression von *Ccl2* mit einem p-Wert von 0,0757 annähernd signifikant und die von *IL-1β*, *Cxcl1*, *Cx3cl1* und *Ccr5* signifikant erniedrigt vor (Appendix, Abbildung 50).

Summa summarum wurde eine Beteiligung des Immunsystems nach Hypertrophie-Stimulation durch TAC-OP in unbehandelten Mäusen gezeigt. Die Genexpressionsanalysen für den langen Nachuntersuchungszeitpunkt, 7 Wochen nach TAC-OP, deuten zudem auf eine langanhaltend gemilderte Immunantwort nach 4-MU-Behandlung hin.

3.3.8.2 Makrophagen-Infiltration im Herzen mittels Mac-2-Färbung

Nach erfolgter Aortenstenose wurde das Herz als primärer Entzündungsort näher untersucht. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass Makrophagen im Akutzeitraum nach TAC-OP ins Herz einwandern und dort die Zusammensetzung der EZM und möglicherweise auch die Hypertrophie-Antwort der Kardiomyozyten beeinflussen können [48]. Es sollte nun geprüft werden, ob die 4-MU-Behandlung die Rekrutierung von Immunzellen nach TAC beeinflusst. Als erster Hinweis diene hierfür die immunhistologische Untersuchung des Makrophagen-spezifischen Oberflächenmarkers Mac-2 von Paraffinherzschnitten (Abbildung 36), die in der 4-MU-behandelten Gruppe mit einem relativen Anteil von $0,12 \pm 0,03$ % im Vergleich zur Kontrollgruppe ($0,25 \pm 0,05$ %) signifikant erniedrigt war ($p = 0,0483$).

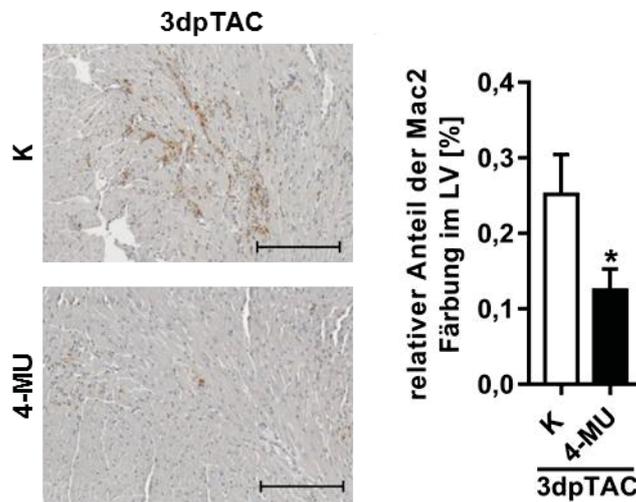


Abbildung 36: Makrophagen-Infiltration im Herzen 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC). Vergleich von 4-Methylumbelliferon-behandelten Mäusen (4-MU) und unbehandelten Kontrollmäusen (K). Repräsentative Aufnahmen der Mac-2-Färbung von Paraffinherzschnitten aus dem linken Ventrikel (Maßstabsbalken entspricht $200 \mu\text{m}$). Relative Quantifizierung der Mac-2-positiven braunen Fläche normiert auf die linksventrikuläre Gewebsfläche (LV). Dargestellt als prozentualer Anteil; Mittelwert \pm SEM; $n = 11$; t -Test; $*p < 0,05$.

3.3.8.3 Veränderungen der Immunzellkomposition im Herzen

Im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse wurde zunächst das Herzgewicht 3 Tage nach TAC-OP gemessen und zwischen Kontroll- und 4-MU-behandelter Gruppe verglichen. Zu diesem frühen Zeitpunkt ist erwartungsgemäß kein Unterschied im Herzgewicht feststellbar, da das hypertrophische *Remodeling* erst nach chronischer Druckbelastung manifestiert (Abbildung 37 A). Die Gesamtzahl der im Durchflusszytometer erfassten Zellen war ebenfalls nicht unterschiedlich (Abbildung 37 B). Ebenso lagen keine Unterschiede bezüglich des prozentualen Anteils der lebenden Zellen (Abbildung 37 C) sowie der TER119-positiven Erythrozyten vor (Abbildung 37 D). Somit sind die nachfolgend dargestellten Unterschiede auf Veränderung der Immunzellpopulation zurückzuführen.

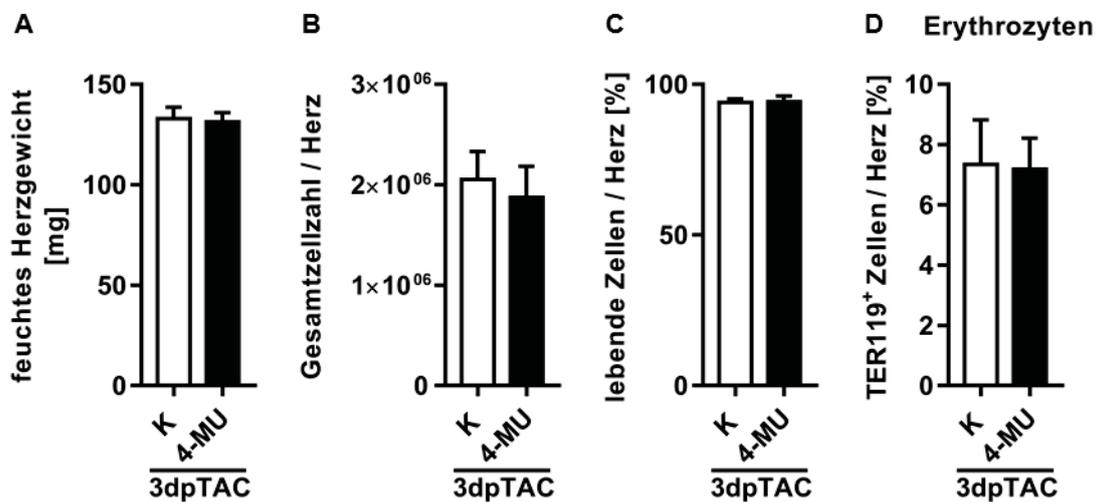


Abbildung 37: Herzgewicht, Gesamtzellzahl, Vitalität der untersuchten Zellen und relativer Anteil der Erythrozyten von durchflusszytometrisch untersuchten Herzen 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC). Es wurden 4-Methylumbelliferon-behandelte Mäuse (4-MU) gegen unbehandelte Kontrollmäuse (K) verglichen. Das Herzgewicht ist als Feuchtwert bei Organentnahme angegeben (A). Absolute Quantifizierung der Gesamtzellzahl pro Herz (B). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der lebenden Zellen normiert auf die Gesamtzellzahl (C). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der TER119⁺-Erythrozyten normiert auf die Gesamtzellzahl (D). Mittelwert ± SEM; n = 8; *t*-Test.

Ergebnisse

Die weißen Blutzellen, die Leukozyten, sind eine heterogene Gruppe von Immunzellen, die die Expression des Oberflächenmarkers CD45 gemein haben. Die Leukozyten werden hinsichtlich ihrer Funktion und anhand weiterer Oberflächenmarker differenziert. Die größten Fraktionen machen dabei die Lymphozyten, bestehend aus B- und T-Zellen, und die granulozytären Zellen myeloiden Ursprungs, wie zum Beispiel Neutrophile und Monozyten, aus.

Die Zahl der gemessenen Leukozyten betrug in beiden Gruppen durchschnittlich zwischen 155583 ± 42630 (4-MU-Gruppe) und 159776 ± 31813 (Kontrollgruppe) (Abbildung 38 A).

Die Lymphozyten wurden als CD11b-negative und CD45-positive Zellen charakterisiert. Anhand dieser indirekten Charakterisierung wurden tendenziell ($p = 0,1543$) weniger Lymphozyten nach 4-MU-Behandlung (10905 ± 1258) im Vergleich zur Kontrollgruppe (16949 ± 3811) detektiert (Abbildung 38 B). Durch die fehlende Messung der Oberflächenmarker CD19 und CD3 war es nicht möglich diese Zellpopulation weiter nach B- und T-Zellen zu differenzieren.

Das Oberflächenprotein CD11b ist ein Marker für Granulozyten myeloiden Ursprungs. Auch bei dieser Zellpopulation war kein Unterschied erkennbar (Abbildung 38 C).

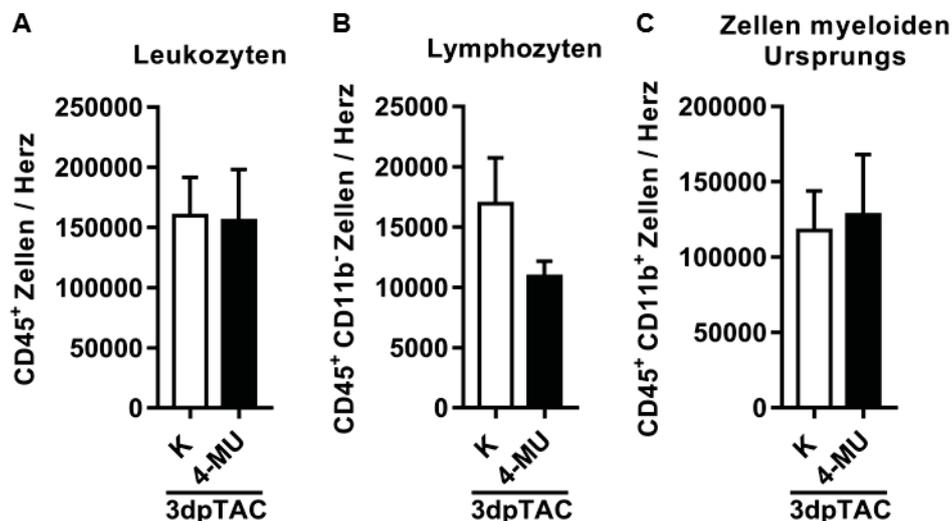


Abbildung 38: Durchflusszytometrische Analyse von Leukozyten aus dem Herzen 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC). Es wurden 4-Methylumbelliferon-behandelte Mäuse (4-MU) gegen unbehandelte Kontrollmäuse (K) verglichen. Absolute Quantifizierung der CD45⁺-Leukozyten pro Herz (A). Absolute Quantifizierung der CD45⁺ CD11b⁻-Lymphozyten pro Herz (B). Absolute Quantifizierung der CD45⁺ CD11b⁺-Zellen myeloiden Ursprungs pro Herz (C). Mittelwert \pm SEM; n = 8; *t*-Test.

Ergebnisse

Die CD11b-positiven Zellen wurden anhand weiterer Oberflächenmarker in unterschiedliche Immunzell-Subtypen aufgeteilt. Besonderer Fokus lag auf der Analyse der Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen. Hierbei wurden keine Unterschiede hinsichtlich der gemessenen Zellzahlen nach 4-MU-Behandlung in den drei genannten Subgruppen gefunden (Abbildung 39 A, B und C).

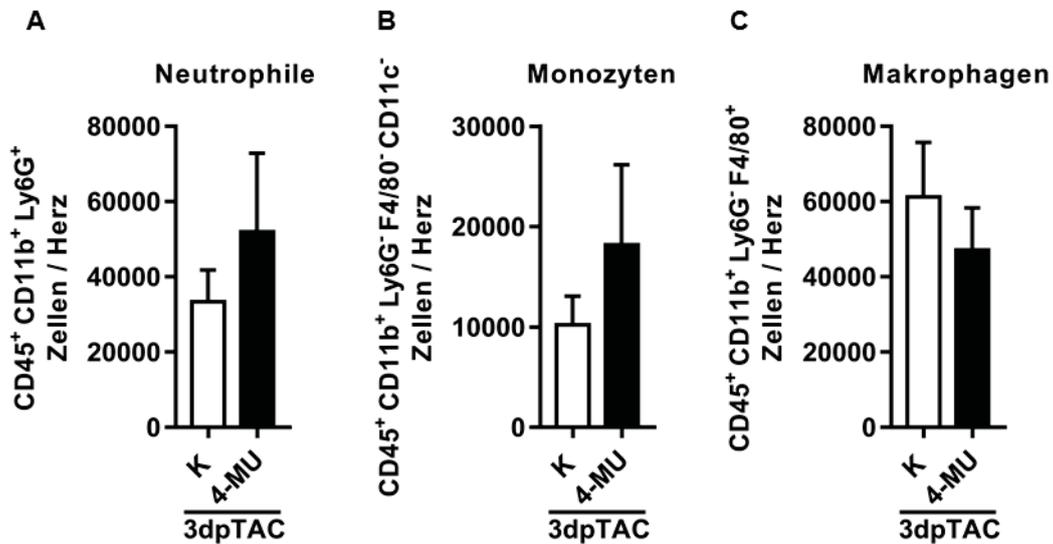


Abbildung 39: Durchflusszytometrische Analyse der myeloiden Zellen im Herzen 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC). Es wurden 4-Methylumbelliferon-behandelte Mäuse (4-MU) gegen unbehandelte Kontrollmäuse (K) verglichen. Absolute Quantifizierung der CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁺-Neutrophilen pro Herz (A). Absolute Quantifizierung der CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁻ F4/80⁻ CD11c⁻-Monozyten pro Herz (B). Absolute Quantifizierung der CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁻ F4/80⁺-Makrophagen pro Herz (C). Mittelwert ± SEM; n = 8; *t*-Test.

Ergebnisse

Da die Makrophagen eine besonders wichtige Rolle im entzündeten Herzen nach TAC spielen (4.3), wurde diese Zellpopulation hinsichtlich der Expression weiterer Oberflächenproteine, die mit unterschiedlichen zellulären Funktionen von Makrophagen einhergehen, untersucht. Hierbei zeigte sich ein deutlicher Trend hinsichtlich verringerter Gesamtzahl von Ly6C^{low}- ($p = 0,0932$) und MHCII-positiven Makrophagen im Herzen 4-MU-behandelter Mäuse ($p = 0,0807$). Es waren hingegen keine Unterschiede für die gemessenen Zellzahlen der Ly6C^{int}- und Ly6C^{high}-Makrophagen erkennbar (Abbildung 40 A, B, C und D).

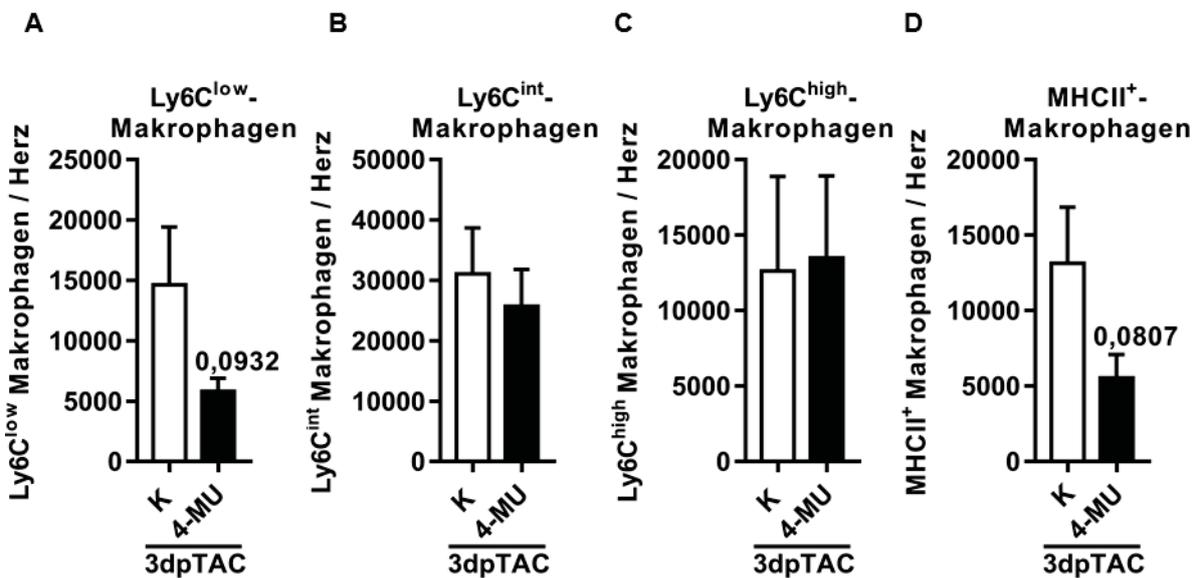


Abbildung 40: Durchflusszytometrische Analyse der Makrophagen im Herzen 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC). Es wurden 4-Methylumbelliferon-behandelte Mäuse (4-MU) gegen unbehandelte Kontrollmäuse (K) verglichen. Absolute Quantifizierung der Ly6C^{low}-Makrophagen pro Herz (A). Absolute Quantifizierung der Ly6C^{int}-Makrophagen pro Herz (B). Absolute Quantifizierung der Ly6C^{high}-Makrophagen pro Herz (C). Absolute Quantifizierung der MHCII⁺-Makrophagen pro Herz (D). Mittelwert \pm SEM; $n = 8$; t -Test.

Zusammenfassend, wurde für den Akutzeitraum, 3 Tage nach TAC-OP, eine Tendenz hinsichtlich geringerer Lymphozytenzahl in Mauserzen nach 4-MU-Behandlung beobachtet. Zudem wurde eine annähernd signifikante Reduzierung der Zellzahlen von Ly6C^{low}- und MHCII-positiven Makrophagen beobachtet, die in Übereinstimmung mit dem Befund der reduzierten Mac2-Färbung im Herzen als Hinweis für eine verringerte Makrophagen-Infiltration nach 4-MU-Gabe diente.

3.3.8.4 Veränderungen der Immunzellkomposition im Blut

In den beiden vorangegangenen Teilen wurde eine reduzierte Makrophagen-Infiltration 3 Tage nach TAC-OP mittels immunhistochemischer Mac-2-Färbung im Herzen nach 4-MU-Behandlung nachgewiesen (3.3.8.2). Dieser Befund wurde weitgehend durch eine durchflusszytometrische Analyse bestätigt, die ebenfalls eine signifikante Reduktion von MHCII-positiven Makrophagen zeigte (3.3.8.3). Daher war es nun von Interesse zu untersuchen, ob 3 Tage nach TAC-OP durch 4-MU-Behandlung Veränderungen in der systemischen Immunzellkomposition bestanden. Dafür wurden die zirkulierenden Immunzellen aus dem Blut durchflusszytometrisch untersucht.

Bei der absoluten Zellzahl der Leukozyten sowie der lymphozytären Leukozyten waren keine Unterschiede vor bzw. 3 Tage nach TAC-OP zwischen der Kontroll- und 4-MU-Behandlungsgruppe detektierbar (Abbildung 41 A und B).

Hingegen waren bei den CD11b-positiven Immunzellen myeloiden Ursprungs signifikante Veränderungen vorhanden (Abbildung 41 C und E). Sowohl bei Betrachtung der absoluten Zellzahlen als auch der relativen Anteile bezogen auf die Gesamtzellzahl der Leukozyten war eine Zunahme dieser Immunzellen in beiden Gruppen 3 Tage nach TAC-OP im Vergleich zum präoperativen Zeitpunkt signifikant.

Bei Betrachtung der relativen Anteile der CD19-positiven CD3-positiven Lymphozyten war nach 7-tägiger 4-MU-Behandlung präoperativ ein signifikant niedrigerer Anteil von Lymphozyten ($35,12 \pm 4,06 \%$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($56,25 \pm 2,35 \%$) evident (Abbildung 41 D). Drei Tage nach TAC-OP blieb der relative Anteil der zirkulierenden Lymphozyten auf einem ähnlich niedrigen Niveau in der Behandlungsgruppe ($24,84 \pm 2,01 \%$), während in der Kontrollgruppe eine starke Abnahme der Lymphozyten von $56,25 \pm 2,35 \%$ auf $28,78 \pm 3,12 \%$ präsent war.

Entsprechend des signifikant reduzierten Anteils der Lymphozyten nach 7-tägiger 4-MU-Gabe kurz vor TAC-OP, war der relative Anteil der CD11b-positiven Zellen präoperativ im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls signifikant erhöht (Abbildung 41 D und E).

Ergebnisse

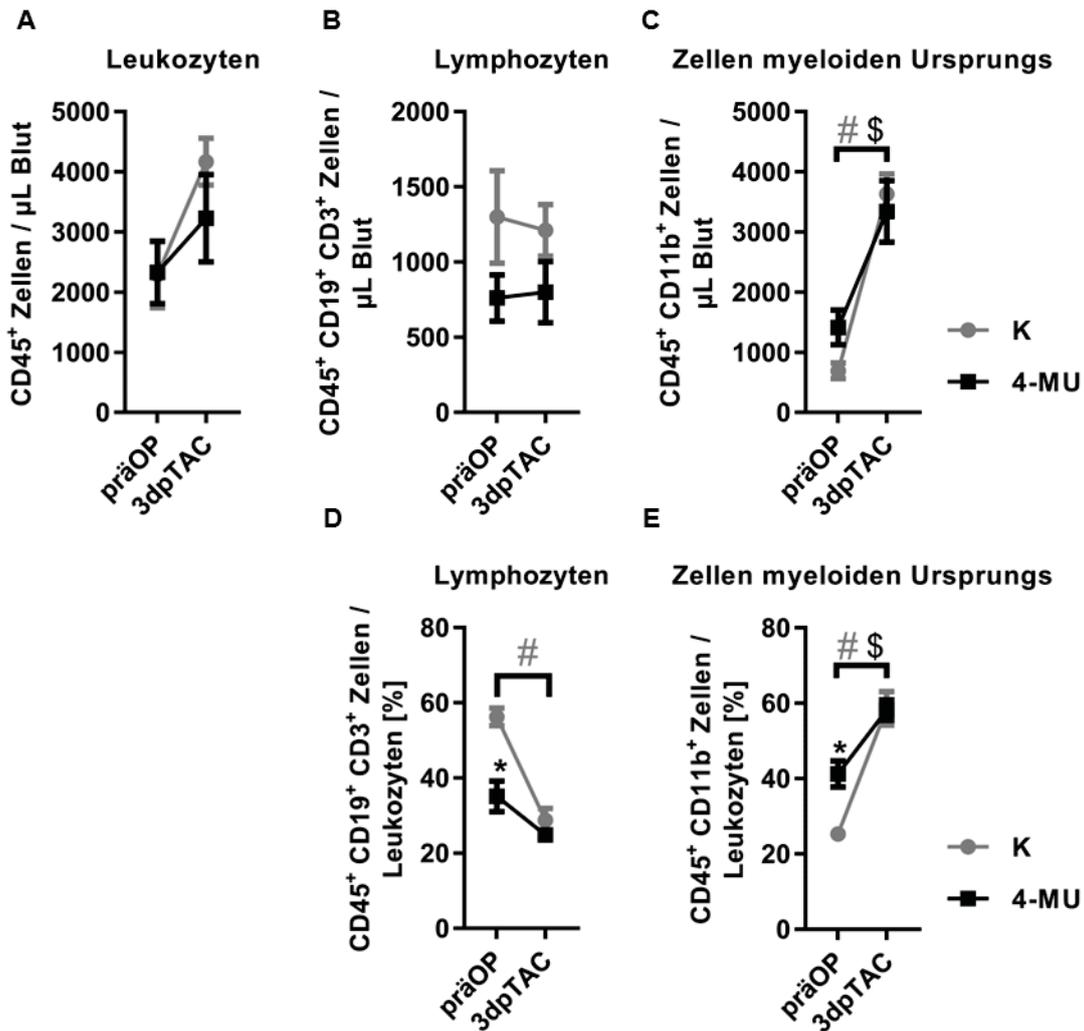


Abbildung 41: Durchflusszytometrische Analyse von zirkulierenden Leukozyten präoperativ (präOP) und 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC). Es wurden 4-Methylumbelliferon-behandelte Mäuse (4-MU) gegen unbehandelte Kontrollmäuse (K) verglichen. Absolute Quantifizierung der CD45⁺-Leukozyten pro μ L Blut (A). Absolute Quantifizierung der CD45⁺ CD19⁺ CD3⁺-Lymphozyten pro μ L Blut (B). Absolute Quantifizierung der CD45⁺ CD11b⁺-Zellen myeloiden Ursprungs pro μ L Blut (C). Relative Quantifizierung der CD45⁺ CD19⁺ CD3⁺-Lymphozyten normiert auf die Gesamtzellzahl der Leukozyten (D). Relative Quantifizierung der CD45⁺ CD11b⁺-Zellen myeloiden Ursprungs normiert auf die Gesamtzellzahl der Leukozyten (E). Mittelwert \pm SEM; n = 8; two-way ANOVA; *p < 0,05 4-MU gegen K; #p < 0,05 präOP^K gegen 3dpTAC^K; \$p < 0,05 präOP^{4-MU} gegen 3dpTAC^{4-MU}.

Ergebnisse

Die Verschiebungen dieser Immunzellpopulation wurden nachfolgend näher untersucht. Die Lymphozyten wurden zunächst nach B- und T-Zellen diskriminiert. Bei Betrachtung der relativen Anteile der CD19-positiven B-Zellen waren keine Unterschiede erkennbar, weder innerhalb der Gruppen noch zwischen beiden Messzeitpunkten (Abbildung 42 A).

Der prozentuale Anteil der CD3-positiven T-Zellen war vor OP in den 4-MU-behandelten Mäusen signifikant niedriger ($17,42 \pm 1,91\%$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($36,70 \pm 3,32\%$). Der relative Anteil der T-Zellen war nur in der Kontrollgruppe im zeitlichen Verlauf 3 Tage nach TAC-OP auf $19,7\%$ signifikant erniedrigt (Abbildung 42 B).

Die T-Zellpopulation wurde nachfolgend weiter differenziert und zwar unterscheidet man zwischen CD4-positiven T-Helferzellen (T_H -Zellen) und CD8a-positiven zytotoxischen T-Zellen (englisch: *cytotoxic T cells*, CTL). Signifikante Unterschiede waren sowohl bei den T-Helferzellen als auch bei den zytotoxischen T-Zellen vorhanden, deren relative Anteile ebenfalls präoperativ signifikant erniedrigt vorlagen im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Abbildung 42 C und D).

Daher waren die Veränderungen der T-Zellpopulation auf den niedrigeren Anteil der T-Helferzellen und der zytotoxischen T-Zellen der 4-MU-Gruppen zurückzuführen.

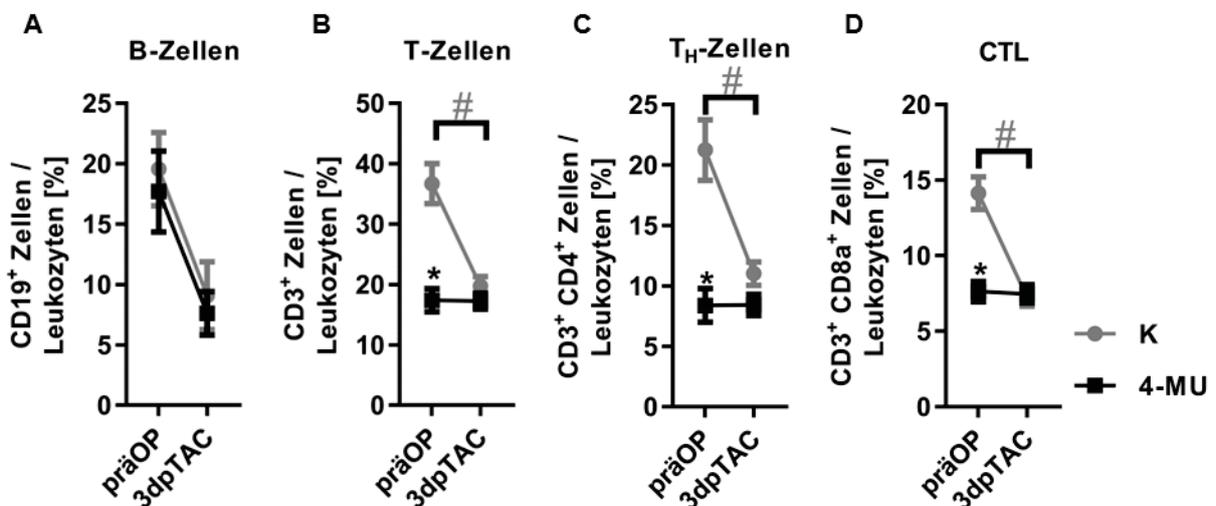


Abbildung 42: Durchflusszytometrische Analyse von zirkulierenden Lymphozyten präoperativ (präOP) und 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC). Es wurden 4-Methylumbelliferon-behandelte Mäuse (4-MU) gegen unbehandelte Kontrollmäuse (K) verglichen. Relative Quantifizierung der CD19⁺-B-Zellen normiert auf die Gesamtzellzahl der Leukozyten (A). Relative Quantifizierung der CD3⁺-T-Zellen normiert auf die Gesamtzellzahl der Leukozyten (B). Relative Quantifizierung der CD3⁺ CD4⁺-T-Helferzellen (T_H -Zellen) normiert auf die Gesamtzellzahl der Leukozyten (C). Relative Quantifizierung der CD3⁺ CD8a⁺-zytotoxischen T-Zellen (CTL) normiert auf die Gesamtzellzahl der Leukozyten (D). Mittelwert \pm SEM; n = 8; two-way ANOVA; *p < 0,05 4-MU gegen K; #p < 0,05 präOP^K gegen 3dpTAC^K.

Ergebnisse

Nachfolgend wurden die signifikant erhöhten Zellzahlen der zirkulierenden CD11b-positiven Immunzellen beider Gruppen 3 Tage nach TAC-OP (Abbildung 41 C und E) durch Charakterisierung weiterer Oberflächenmarker näher betrachtet.

Die Subpopulation der CD11b- und Ly6G-positiven Neutrophilen zeigte ebenfalls einen signifikanten Anstieg der absoluten Zellzahlen im zeitlichen Verlauf nach TAC-OP. Es waren jedoch unter 4-MU-Behandlung keine gruppenübergreifenden Unterschiede erkennbar (Abbildung 43 A).

Ebenso waren bei den Ly6G-negativen und CD115-positiven Monozyten auch keine Unterschiede zwischen der 4-MU-Gruppe und der Kontrollgruppe feststellbar. Auffällig war jedoch, dass ein Anstieg der Zellzahlen nur in der Kontrollgruppe 3 Tage nach TAC-OP evident war, während der Anstieg in der 4-MU-behandelten Gruppe keine statistische Signifikanz aufwies (Abbildung 43 B).

Die Monozyten wurden auf Grundlage der Expression von Ly6C als *low*, *intermediate* und *high* klassifiziert bezogen auf die Expressionsstärke dieses Oberflächenmarkers. Den verschiedenen Klassen werden gemäß Literatur unterschiedliche Funktionen zugesprochen (4.3). Präoperativ waren keine Unterschiede in den absoluten Zellzahlen dieser Klassen unter 4-MU-Behandlung ermittelt worden. Drei Tage nach TAC-OP war der Anstieg der zirkulierenden Ly6C^{low}-Monozyten in beiden Gruppen signifikant. Der Anstieg dieser Zellen war in den 4-MU-behandelten Mäusen dennoch weniger stark ausgeprägt, da zum Messzeitpunkt nach TAC-OP die absolute Zellzahl der Ly6C^{low}-Monozyten signifikant niedriger war im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 43 C).

Bei Betrachtung der Ly6C^{int}-Monozyten waren weder im zeitlichen Verlauf noch gruppenübergreifend statistisch relevante Unterschiede erkennbar (Abbildung 43 D).

Die absolute Zellzahl der Ly6C^{high}-Monozyten war lediglich in der Kontrollgruppe 3 Tage nach TAC-OP im Vergleich zum präoperativen Zeitpunkt signifikant erhöht, während die Zellzahl der 4-MU-Gruppe nicht signifikant anstieg (Abbildung 43 E).

Ergebnisse

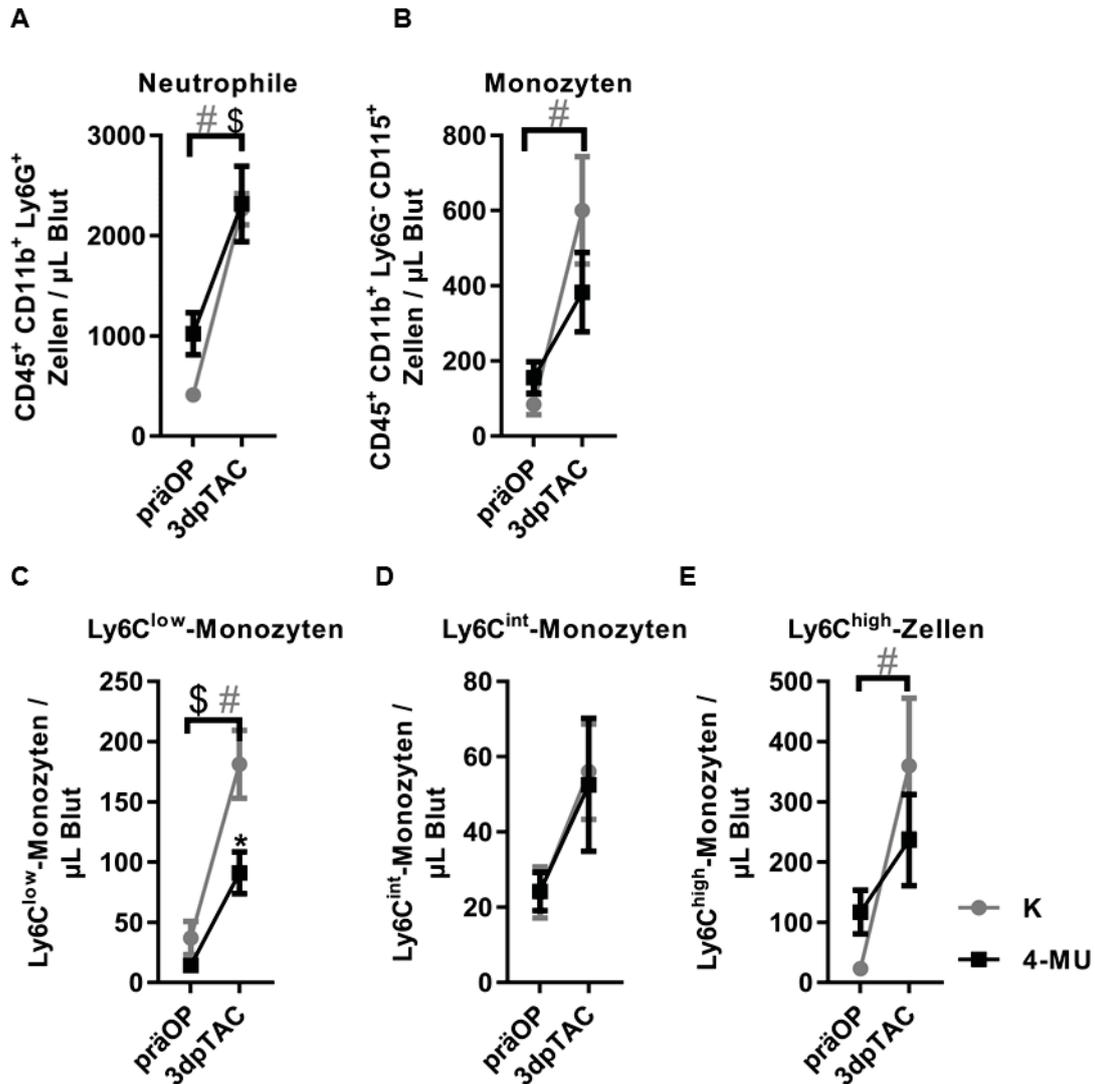


Abbildung 43: Durchflusszytometrische Analyse von zirkulierenden myeloiden Zellen präoperativ (präOP) und 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC). Es wurden 4-Methylumbelliferon-behandelte Mäuse (4-MU) gegen unbehandelte Kontrollmäuse (K) verglichen. Absolute Quantifizierung der CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁺-Neutrophilen pro μL Blut (A). Absolute Quantifizierung der CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁻ F4/80⁻ CD11c⁺-Monozyten pro μL Blut (B). Absolute Quantifizierung der Ly6C^{low}-Monozyten pro μL Blut (C). Absolute Quantifizierung der Ly6C^{int}-Monozyten pro μL Blut (D). Absolute Quantifizierung der Ly6C^{high}-Monozyten pro μL Blut (E). Mittelwert \pm SEM; n = 8; two-way ANOVA; *p < 0,05 4-MU gegen K; #p < 0,05 präOP^K gegen 3dpTAC^K; §p < 0,05 präOP^{4-MU} gegen 3dpTAC^{4-MU}.

Zusammenfassend wurden insbesondere basale Verschiebungen in verschiedenen Immunzellpopulation unter 4-MU-Behandlung festgestellt. Präoperativ war der relative Anteil der T-Zellen (T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen) signifikant erniedrigt, während der relative Anteil der Immunzellen myeloiden Ursprungs nach 4-MU-Behandlung dementsprechend signifikant erhöht war. Drei Tage nach TAC-OP war einzig die Gesamtzellzahl der zirkulierenden Ly6C^{low}-Monozyten in den 4-MU-behandelten Gruppe signifikant erniedrigt. Diese Veränderungen dienen als erster Anhaltspunkt für eine immunmodulatorische Wirkung von 4-MU in der Akutphase nach operativer Aortenstenose.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Glykosaminoglykans HA während myokardialer Umbauprozesse in der Pathogenese der kardialen Hypertrophie untersucht. Zu diesem Zwecke wurden ein *in vitro*-Zellmodell sowie zwei *in vivo*-Mausmodelle eingesetzt.

Hierbei wurde im Rahmen einer Vorstudie gezeigt, dass bei 8 Wochen alten Mäusen in einem genetischen Hypertrophie-Modell vor Manifestation des HCM-Phänotyps eine deutliche Dysregulation von Genen beziehungsweise Proteinen der EZM stattfand. Dies wurde insbesondere durch Annotation von GO *terms* auf Grundlage der Transkriptom-Daten gezeigt, in denen vorwiegend Gene kodierend für EZM-Proteine angereichert vorlagen. In Übereinstimmung damit wurde zudem eine erhöhte Abundanz von EZM-Proteinen mittels MS-Analyse gemessen. Auffällig war dabei, dass der GO *term glycosaminoglycan binding* in der Kategorie molekulare Funktion am stärksten angereichert vorlag. Auch die Genexpression des CD44-Rezeptors, der für die HA-Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielt, war in der qPCR-Analyse mehr als 10-fach hochreguliert. Im Zuge von Validierungsexperimenten wurden zudem gezeigt, dass die Genexpression der *Has2* im Herzen 3 Tage nach TAC angestiegen war.

In diesem Kontext wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Glykosaminoglykan HA, welches im Extrazellularraum als wichtiges Struktur- und Signalmolekül fungiert, eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung myokardialer Hypertrophie ausüben könnte, so wie es bereits für andere Herz-Kreislaufkrankungen gezeigt wurde.

Zur Aufklärung dieser Hypothese wurden zunächst in einem *in vitro*-Zellmodell kultivierte Kardiomyoblasten nach Isoprenalin-vermittelter Hypertrophie-Stimulation mit 4-MU, einem etablierten HA-Synthese-Inhibitor, behandelt. Hierbei wurde durch den Einsatz von 4-MU die Isoprenalin-induzierte Hypertrophie der Zellen verhindert.

In vivo wurden in einem Hypertrophie-Mausmodell nach operativer Aortenstenosierung 4-MU-behandelte Mäuse mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Unter Verwendung histologischer und molekularbiologischer Methoden wurde beobachtet, dass das Ausmaß der Entwicklung von Fibrose und Hypertrophie durch 4-MU-Behandlung vermindert war. Echokardiografische Untersuchungen zeigten zudem, dass die kontraktile Herzfunktion im Vergleich zur Kontrollgruppe verbessert war. Da 4-MU auch immunmodulatorische Eigenschaften beigemessen werden und Inflamationsprozesse während des hypertrophischen *Remodeling* von hoher Bedeutung sind, wurde der Inflamationsstatus durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei zeigte sich für den Akutzeitraum nach TAC-OP eine verminderte Makrophagen-Infiltration.

Nachfolgend werden die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse im Kontext der aktuellen wissenschaftlichen Fachliteratur für Herzforschung eingeordnet und auf dieser Grundlage kritisch diskutiert.

4.1 Die Bedeutung der Extrazellulärmatrix und Hyaluronsäure in der Pathogenese der hypertrophischen Kardiomyopathie

Als Modell-Organismus zur Untersuchung der Pathogenese einer HCM dienten transgene Mäuse, die zwei Punktmutationen (VM/RC) im Gen für das kardiale Myosin tragen. Wie unter 1.1.3.2 beschrieben entwickelten die VM/RC-Mäuse bereits in einem frühen Lebensalter ab 10 Wochen eine starke Fibrose, die folglich auch mit einer zunehmenden Hypertrophie-Entwicklung und Funktionsstörung des Herzens einherging sowie durch eine verkürzte Lebenserwartung gekennzeichnet war [35]. In einem Lebensalter von 6 bis 8 Wochen war allerdings makroskopisch noch keine Manifestation des HCM-Phänotyps zu beobachten. In diesem Zusammenhang war das auf das Körpergewicht normalisierte Herzgewicht unverändert im Vergleich zu WT-Kontrollmäusen, sodass noch keine globale Hypertrophie feststellbar war obwohl das myokardiale *Remodeling* ab einem Lebensalter von 10 Wochen kurz bevorstand. Daher wurden in diesem HCM-Modell 6 bis 8 Wochen alte Tiere verwendet, um potentielle Signalmoleküle zu identifizieren, die eine Hypertrophie-Entwicklung vermitteln.

4.1.1 Erkenntnisse aus den Transkriptom- und Proteom-Analysen

Zu diesem Zwecke kamen Transkriptom- und Proteom-Analysen zum Einsatz. Die Lebenswissenschaften beschreiben einen Informationsfluss der kodierenden DNA zur RNA, die schließlich in ein Protein translatiert wird, welches als funktionelle Einheit einer Merkmalsausprägung dient [118]. Allerdings wurde bereits in zahlreichen Studien gezeigt, dass innerhalb eines Modells die Übereinstimmung von regulierten Transkripten und Proteinen entgegen der Erwartung relativ gering war [119-123]. Ghazalpour *et al.* führten eine Studie in Mäusen durch mit dem Ziel Transkriptom- und Proteom-Daten zu vergleichen und kamen zu dem Schluss, dass das Verhältnis von mRNA-Transkripten zur Protein-Abundanz lediglich eine mäßige Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,27$ aufzeigte. Zudem postulierten sie, dass die Expressionsstärke von mRNA-Transkripten, und nicht wie erwartet die von Proteinen, stärker mit dem betrachteten Phänotyp korrelierten [118].

Es wurden viele mögliche Ursachen für die moderate Übereinstimmung von Transkriptom- und Proteom-Datensätzen diskutiert. Grundsätzlich spielen viele regulatorische Prozesse während Transkription und Translation eine bedeutende Rolle. So ist beschrieben, dass die zelluläre Transkriptionsrate erheblich niedriger ist als die Translationsrate von Proteinen. In Säugetierzellen werden im Mittel nur zwei Kopien eines Gens pro Stunde produziert während die mittlere Translationsrate von Proteinen 140 pro Stunde beträgt. Auch die mediane Halbwertszeit von mRNA-Transkripten ist mit 9 Stunden sehr viel kürzer als die von Proteinen mit 46 Stunden. Von weiterer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang auch, dass

Diskussion

sich die Halbwertszeit von Proteinen über einen größeren dynamischen Bereich von < 30 min bis > 200 Stunden bewegt. So korreliert etwa die Genexpression von konstitutiv exprimierten Genen (zum Beispiel Tubulin [124]) mit einer längeren Halbwertszeit besser mit der jeweiligen Protein-Abundanz als die Genexpression von regulatorischen Proteinen, die in Abhängigkeit eines Stimulus schnell auf- bzw. abgebaut werden [125, 126]. Daher haben beide methodische Ansätze in unserem Versuchsaufbau eine Daseinsberechtigung.

Übereinstimmend wurden mittels beider Methoden insgesamt 9 Transkripte bzw. Proteine identifiziert, die gleichermaßen eine veränderte Abundanz aufwiesen (Abbildung 16). Bei diesen Treffern handelt es sich grundsätzlich um Proteine, die in den Extrazellularraum exprimiert werden, wie z. B. Kollagen Typ VI, Lumican, Periostin oder Fibronectin. Daher wurde analog gezeigt, dass insbesondere Proteine der EZM noch vor Einsetzen des myokardialen *Remodeling* bereits auf RNA- und Proteinebene dysreguliert vorliegen.

Die Auswahl einer oder mehrerer vielversprechender Kandidatengene, die potentiell an der Pathogenese der HCM beteiligt sind, ist in Anbetracht der hohen Zahl der regulierten Transkripte (119 bei $p < 0,01$) und Proteine (121 bei $FDR < 0,01$) schwierig. Um die umfangreichen Datensätze aus den Transkriptom- und Proteom-Analysen auf globalerer Ebene zu untersuchen, erfolgte eine Annotation von GO *terms*, die jedem Gen bzw. Protein eine übergeordneten funktionelle Gruppe zuordnet. Werden einer funktionellen Gruppe, wie beispielsweise einem apoptotischen Signalweg, besonders viele Vertreter im Sinne von regulierten Transkripten zugeordnet, so liegt dieser GO *term* mit einem hohem *Enrichment factor* stark angereichert vor. Somit wird geschlussfolgert, dass diesem Signalweg für Apoptose eine besonders hohe biologische Relevanz in dem untersuchten Modell zukommt.

Summa summarum wurden mittels beider *screening*-Methoden Hinweise auf eine starke Dysregulation von EZM-Proteinen erhalten (Tabelle 5, Tabelle 8), obwohl zu diesem Zeitpunkt in den 6 bis 8 Wochen alten VM/RC-Mäusen makroskopisch noch kein myokardiales *Remodeling* zu beobachten war. Daher wurde geschlussfolgert, dass es sich bei diesen Veränderungen nicht um sekundäre Kompensationsmechanismen handelt, sondern dass diese primär an der Pathogenese beteiligt waren.

4.1.2 Die Hyaluronsäure als potentielles Schlüsselmolekül?

Ein wichtiger Bestandteil der EZM ist das Glykosaminoglykan HA, das sowohl als Struktur- als auch als Signalmolekül agiert [62]. Interessanterweise war der GO *term glycosaminoglycan binding* der am stärksten angereicherte GO *term* in der Kategorie molekulare Funktion in der Transkriptom-Analyse der VM/RC-Herzen (Tabelle 7). Zudem wurde der HA-Rezeptor CD44, der eine wichtige Rolle für die HA-Signaltransduktion spielt,

Diskussion

als stark angereichertes Transkript (10,05-fach) auf Genexpressionsebene mittels qPCR detektiert (Abbildung 12).

Ein weiteres Argument für eine potentiell wichtige Rolle beim myokardialen *Remodeling* im Rahmen der Hypertrophie-Entwicklung resultiert aus Forschungsarbeiten unseres Instituts für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie in Düsseldorf an verschiedenen Tiermodellen für Herz-Kreislaferkrankungen. Sie zeigten, dass HA bei Myokardinfarkt und in der Pathogenese der Atherosklerose eine hohe Bedeutung zukommt [72, 73]. So wurde in der akuten Phase nach Myokardinfarkt eine Akkumulation von HA im Herzgewebe von Mäusen und Ratten gezeigt [127]. Eine Hemmung der HA-Synthese durch eine Deletion der *Has2* hingegen beeinträchtigte die Heilungsphase des Herzens nach Ischämie und Reperfusion [128]. Ferner konnte eine *Has3*-Defizienz in Atherosklerose-Modellen den Immunphänotyp verändern und die Progression der Gefäßerkrankung verringern [72].

Andere Arbeitsgruppen haben in einem Rattenmodell nach operativer Aortenstenose bereits eine Korrelation der Genexpression von *Has1* und *Has2* und der fetalen Genexpression von *Myh7* beschrieben [129]. Hellman *et al.* postulierten zudem, dass auch ein möglicher Zusammenhang zwischen der Genexpression von EZM-assoziierten Proteinen und der HA-Synthese besteht, die unter Kontrolle eines gemeinsamen regulatorischen Mechanismus stehen. Dafür sprach eine Genexpressionsanalyse der EZM-assoziierten Proteine, in der gezeigt wurde, dass deren Expressionsstärken mit der gemessenen HA-Konzentration im hypertrophierten Herzgewebe gut korrelierte. In diesem Kontext wurde gezeigt, dass zu Beginn des myokardialen *Remodeling*, die Expression der Transkriptionsfaktoren *Myc*, *Fos*, *Junb* sowie *Egr1* erhöht vorlagen. Diese Transkriptionsfaktoren regulieren unter anderem die Expression der untersuchten EZM-assoziierten Proteine. Auch eine Hochregulation des *Ace* (*Angiotensin-converting enzyme*)-Gens wurde belegt, das die Umsetzung von AT I zu AT II katalysiert. Letzterer kann die Expression der genannten Transkriptionsfaktoren und das fetale Genprogramm (beispielsweise *Myh7*, *Anp* und *Bnp*) induzieren und spielt daher eine zentrale Rolle in der Entstehung der kardialen Hypertrophie [60].

Da das Polysaccharid HA nicht genetisch kodiert ist, kann es weder mittels *Gene Array* noch MS detektiert werden. Jedoch ist eine Messung der Genexpression der drei *Has*-Isoformen mittels qPCR möglich. Während dieser Validierungsexperimente wurde unser Verdacht, dass HA während des myokardialen *Remodeling* von Bedeutung sein könnte, durch Genexpressionsanalysen mittels qPCR bestärkt, da ein erheblicher Anstieg der *Has2*-Genexpression in einem Hypertrophie-Mausmodell nach operativer Aortenstenose im Akutzeitraum 3 Tage nach TAC-OP beobachtet wurde (Abbildung 19). Weiterhin war die *Has3*-Genexpression nach chronischer Druckbelastung (7 Wochen nach TAC) ebenfalls stark erhöht (Abbildung 30).

Diskussion

Die drei HAS-Enzyme haben gemein, dass sie HA synthetisieren, ihre Relevanz in unterschiedlichen Geweben und Zellkompartimenten scheint jedoch verschieden zu sein. Wie bereits erwähnt, ist die HAS2 im Herzen von großer funktioneller Bedeutung, da eine genetische Deletion während der Embryogenese aufgrund einer fehlerhaften kardiovaskulären Morphogenese letal ist [71], während *Has1*- und *Has3*-defiziente Mäuse lebensfähig sind [130, 131]. Des Weiteren ist die zelluläre als auch gewebsspezifische Lokalisation der HAS-Enzyme abhängig von der jeweiligen Isoform. Alle drei HAS-Isoenzyme wurden an der Plasmamembran und in unterschiedlichen intrazellulären Organellen nachgewiesen. HAS1 zeigte eine starke Akkumulation im Golgi-Apparat, HAS2 im endoplasmatische Retikulum und HAS3 im Golgi-Apparat sowie an den fadenförmigen Zellfortsätzen, den sogenannten Mikrovilli. Eine starke Anreicherung von HA *per se* ist während der Embryonalentwicklung in Geweben des mesodermalen Ursprungs, wie beispielsweise im Herzen oder Knorpel, zu beobachten. Insbesondere in den Herzklappen ist embryonal die Abundanz von HAS2 übereinstimmend mit dessen Expressionsstärke erhöht. Dermale Fibroblasten hingegen exprimieren alle drei HAS-Isoenzyme mit ähnlicher Expressionsstärke [132, 133]. In unserem Mausmodell wurde die *Has3* im adulten und gesunden Herzen aufgrund der hohen Expressionsstärke mit 71,3 % im Vergleich zu *Has1* und *Has2* als Hauptisoform bestimmt (Abbildung 18). Auch die Kettenlänge der HA-Polymere ist von der *Has*-Isoform abhängig. Bei *in vitro* Transfektionsstudien wurde dargelegt, dass HAS1 sowie HAS3 HA-Polymere eines Molekulargewichts von 2×10^5 bis 2×10^6 Dalton synthetisieren, während HAS2 mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 2×10^6 Dalton deutlich längere HA synthetisiert [57].

Aufgrund der erhobenen Daten durch Transkriptom- und Proteom-Analyse, die übereinstimmend eine zentrale Rolle der EZM-Proteine noch vor Einsetzen des myokardialen *Remodeling* zeigten, und auf Grundlage aktueller Fachliteratur, die eine wesentliche Beteiligung der HA im Kontext von Herz-Kreislaufkrankungen postulieren, fiel unsere Wahl auf das Glykosaminoglykan HA als potentiell bedeutsames Molekül während einer Hypertrophie-Entwicklung des Herzens.

4.2 Pharmakologische Modulation der Hyaluronsäure-Synthese durch 4-Methylumbelliferon im Hypertrophie-Modell

Um die Rolle der HA während der Hypertrophie-Entwicklung zu untersuchen, wurde mittels des Cumarin-Derivats 4-MU eine pharmakologische Inhibition der HA-Synthese in einem *in vitro* sowie *in vivo* Hypertrophie-Modell durchgeführt. Die Substanz 4-MU depletiert den für die HA-Synthese notwendigen zytosolischen UDP-GlcA-Pool. Die Substratverarmung führt zu einer spezifischen Inhibition der HA-Synthese. Im Gegensatz zu anderen Glykosaminoglykanen, wird HA nicht im Golgi-Apparat sondern an der Plasmamembran synthetisiert. Dies hat den großen Vorteil, dass gezielt die Synthese von HA blockiert wird, da dessen Synthese vom zytosolischen UDP-GlcA-Pool abhängig ist [86].

Aufgrund der früheren Zulassung als Arzneimittel zur Behandlung von Gallenwegsspasmen lässt sich ein weiterer bedeutender Vorteil einer 4-MU-Behandlung ableiten. Im Rahmen des Arzneimittelzulassungsverfahrens hat 4-MU toxikologische Unbedenklichkeitsüberprüfungen durchlaufen und schließlich auch bestanden. Daher gilt 4-MU als sichere und nebenwirkungsarme Substanz für Mensch und Tier [82, 83]. Auch die perorale Verabreichung war einer intraperitonealen Applikationsform hinsichtlich therapeutischer Wirksamkeit überlegen und ist daher sowohl im Versuchsmodell als auch im Hinblick auf eine klinische Translation im Menschen praktikabel [87].

4.2.1 Applikation von 4-Methylumbelliferon in einem *in vitro*-Hypertrophie-Modell

Zunächst wurden jedoch in einem *in vitro*-Zellmodell unter 4-MU Behandlung weitere Hinweise für eine Beteiligung der HA während einer kardialen Hypertrophie-Entwicklung gesucht. Die H9C2-Kardiomyoblasten stellen ein etabliertes Hypertrophie-Modell dar. Hellman *et al.* haben ebenfalls in einem *in vitro*-Modell mit kultivierten Kardiomyozyten gezeigt, dass auch dieser Zelltyp nach Stimulation mit dem Wachstumsfaktor PDGF-BB HA produziert, obwohl im Herzgewebe die Fibroblasten als Hauptproduzent beschrieben sind [134]. Ebenso wurde in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung des HAP Sandwich ELISA-ähnlichen Assay gezeigt, dass von H9C2-Zellen sekretierte HA im Zellüberstand nachweisbar ist (Abbildung 21). Unter 4-MU-Behandlung wurde nach Hypertrophie-Stimulation durch Isoprenalin ein vermindertes Größenwachstum der H9C2-Zellen beobachtet (Abbildung 20). Die inhibitorische Wirkung von 4-MU auf die HA-Synthese wurde durch eine HA-Quantifizierung des Zellüberstands bestätigt (Abbildung 21). Allerdings war keine Hemmung der HA-Synthese mittels 4-MU in hypertrophierten Zellen nach Isoprenalin-Stimulation erkennbar. Eine mögliche Ursache für den fehlenden Nachweis einer 4-MU-vermittelten Inhibition ist, dass nach einer Doppelbehandlung von 4-MU und Isoprenalin nicht

nur die sekretierte HA im Zellüberstand bei der HA-Messung erfasst wird, sondern auch die intrazellulär vorliegende HA [135]. Denn aufgrund des kardiotoxischen Effekts durch eine Isoprenalin-Behandlung [136] wäre eine erhöhte Apoptose der kultivierten H9C2-Zellen denkbar, in deren Folge das Zytoplasma einschließlich der intrazellulären HA freigesetzt wird. Damit würde die HA-Konzentration im Zellüberstand steigen. Aus diesem Grund kann an dieser Stelle ein inhibitorischer Effekt von 4-MU auf die HA-Synthese lediglich in nicht-stimulierten H9C2-Zellen dargelegt werden.

Die Isoprenalin-vermittelte Hypertrophie-Induktion konnte in H9C2-Zellen durch Zugabe von 4-MU verringert werden. Dieser Befund stellte einen weiteren Hinweis dar, dass HA an einer Hypertrophie-Entwicklung beteiligt ist.

4.2.2 Pharmakokinetische Parameter von 4-Methylumbelliferon in Mausmodellen

Als nächstes wurde die Rolle der HA in einem *in vivo*-Hypertrophie-Mausmodell untersucht. Dafür wurde wieder die HA-Synthese mit 5 %-igem 4-MU-Futter inhibiert, das *ad libitum* angeboten wurde. Kuipers *et al.* haben in einer Studie mit wildtypischen C57BL/6J-Mäusen die pharmakokinetischen Parameter für dieses Fütterungsmodell untersucht. Unter Verwendung von 5 %-igem 4-MU-Futter wurden täglich durchschnittlich 150 – 250 mg 4-MU von den Tieren aufgenommen. Die 4-MU-Plasmaspiegel nach einer zweiwöchigen Fütterung betragen durchschnittlich $5,1 \pm 2,9 \mu\text{M}$. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von 4-MU zur Hemmung der HA-Synthese wurde bisher lediglich in kultivierten Tumorzellen bestimmt und betrug in diesem *in vitro*-Zellmodell $400 \mu\text{M}$ [88]. Im *in vivo*-Modell waren die Plasmaspiegel der beiden Metaboliten, dem glukuronidierten 4-MU (4-MU-GlcA: $1519 \pm 189 \mu\text{M}$, $p < 0,05$) und dem sulfatierten 4-MU (4-MU-S: $119 \pm 8 \mu\text{M}$, $p < 0,05$), stark erhöht [87]. Dies ist in Übereinstimmung mit einer in Menschen durchgeführten Studie, in der ebenfalls 4-MU-GlcA als der im Plasma am stärksten konzentrierte Metabolit bestimmt wurde. Die niedrige Bioverfügbarkeit ($< 2\%$) von 4-MU kann durch eine schnelle Metabolisierung und die kurze Halbwertszeit von $28 \pm 2 \text{ min}$ begründet werden [137]. Nach einer zweiwöchigen Fütterung mit 0,65 %-igem 4-MU-Futter waren die gemessenen Plasmakonzentrationen von 4-MU und dessen Metaboliten sehr gering und bewegten sich im unteren mikromolaren Konzentrationsbereich [87]. Aus diesen Gründen ist eine 5%-ige 4-MU-Fütterung notwendig, um ausreichend hohe Plasmaspiegel zu erreichen, bei der nachweislich eine therapeutische Wirksamkeit in einem Autoimmun-Modell (Mäuse nach experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis) und einem Typ-1-Diabetes-Modell (D011.10xRIPmOVA Mäuse) vorliegt. Im Gegensatz dazu war eine zweiwöchige Fütterung mit 0,65 %-igem 4-MU-Futter in diesen beiden Modellen wirkungslos. Bei diesem

Fütterungsmodell ist jedoch zu beachten, dass erst nach einer 7-tägigen Behandlung mit 5 %-igem 4-MU-Futter eine Reduktion der HA-Plasma-Konzentrationen nachweisbar war. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass die 4-MU-behandelten Mäuse vor allem während der ersten Woche der Behandlung aufgrund mangelnder Akzeptanz wenig Futter aufgenommen haben und aufgrund der niedrigen 4-MU-Plasmaspiegel noch kein Effekt auf die HA-Plasma-Konzentration zu erwarten wäre.

Nichtsdestotrotz entspricht dieses Fütterungsmodell aus den oben genannten Gründen dem aktuellen Konsensus vieler Forschungsgruppen hinsichtlich 4-MU-Konzentration (5%), perorale Applikationsform und einer 7-tägigen Vorbehandlung [108, 138, 139]. Daher fiel die Entscheidung zugunsten dieses erprobten Fütterungsmodell.

4.2.3 Detektion der Hyaluronsäure nach 4-Methylumbelliferon-Behandlung

Nachfolgend wurden im Rahmen der Hauptstudie die Mausherzen nach operativer Aortenstenose unter 4-MU-Behandlung morphologisch und funktionell untersucht. Als Wirksamkeitsnachweis sollte zunächst die 4-MU-vermittelte Inhibition der HA-Synthese in unserem Versuchsmodell bestätigt werden. Aufgrund der fehlenden immunogenen Struktur von HA ist ein Antikörper-basierter Nachweis nicht möglich. Um dennoch eine Veränderung in der HA-Synthese auf Produktebene zu bestimmen, erfolgte eine histologische Färbung mittels biotinylierten HABP, das spezifisch und stark die HA bindet. Drei Tage nach TAC-OP war jedoch nur ein Trend für eine reduzierte HABP-Färbung nach 4-MU-Behandlung im Herzwewebe erkennbar (Abbildung 28). Mögliche Ursachen für den fehlenden Nachweis einer 4-MU-vermittelten Hemmung der HA-Synthese könnten sein, dass ein ungünstiger Nachbeobachtungszeitraum gewählt wurde oder der Stichprobenumfang für eine möglichst hohe Trennschärfe des statistischen Tests nicht ausreichend war. Alternativ stehen noch andere Methoden zur HA-Quantifizierung zur Verfügung, wie zum Beispiel die *fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis* (FACE) [140] oder die *high performance liquid chromatography* (HPLC) [141], die jedoch im Rahmen unserer Arbeitsgruppe nicht verfügbar waren. Als Nachbeobachtungszeitraum wurden 3 Tage bzw. 7 Wochen nach dem operativen Eingriff gewählt. In einem Rattenmodell nach operativer Aortenstenose und Schein-OP wurde dokumentiert, dass der operative Eingriff *per se* bereits einen Stimulus für eine gesteigerte HA-Synthese darstellt. In diesem Zusammenhang wurde 6 Tage nach TAC- und Schein-OP kein Unterschied in der HABP-Färbung des Herzwebes abgebildet [129]. Diese Beobachtung wurde mittels unserer HABP-Färbung in den unbehandelten Kontrollgruppen 3 Tage nach OP bestätigt (Abbildung 28). Die Mittelwerte der scheinoperierten Mäuse wiesen eine ähnlich starke Ausprägung der HABP-Färbung auf wie die Mäuse nach TAC-

Diskussion

OP. Nach 4-MU-Behandlung war sowohl nach Schein- als auch nach TAC-OP ein Trend hinsichtlich erniedrigter HA-Akkumulation im Herzgewebe erkennbar. Interessanterweise, wurden 3 Tage nach TAC-OP in beiden Behandlungsgruppen für *Has2* eine signifikante Hochregulation mit Genexpressionsanalysen dokumentiert (Abbildung 30). Da die *Has3* im Vergleich zu *Has1* und *Has2* mit 71,3 % die Hauptisoform im gesunden Herzen darstellt (Abbildung 18), ist es möglich, dass nach TAC-OP eine Hochregulation der *Has2* auf mRNA-Ebene nicht ausreichend ist um diese auf auch Produktebene mittels HABP nachzuweisen. Zudem wird die Abundanz der HA noch durch andere zelluläre Prozesse reguliert (1.2.2). Grundsätzlich wurde jedoch schon in anderen Studien an Mensch und Tier belegt, dass während der kardialen Hypertrophie eine erhöhte HA-Synthese vorliegt [129, 142], so auch in HCM-Patienten, die eine stärkere HABP-Färbung des Herzgewebes im Vergleich zu gesunden Probanden zeigten.

In der Fachliteratur ist bekannt, dass selbst nach einer Langzeitbehandlung mit 4-MU keine vollständige Hemmung der HA-Synthese möglich ist [108, 138, 139]. Es wird spekuliert, dass die HA, die mit HA-bindenden Proteinen, den sogenannten Hyaladherinen, quervernetzt ist, vor dem Abbau geschützt ist und daher noch lange Zeit im Gewebe nachweisbar ist [143]. In einem Mausmodell für Atherosklerose wurde zudem dokumentiert, dass sich sowohl die systemische HA-Plasmakonzentration als auch die HA-Akkumulation im Aortenursprung nach einer 17-wöchigen 4-MU-Behandlung wieder angleichen [108]. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied unter 4-MU-Behandlung 7 Wochen nach TAC-OP mittels HABP-Färbung im Herzgewebe beobachtet (Abbildung 31). Dieser Befund wurde auch durch Genexpressionsanalysen der Hauptisoform *Has3*, die in beiden Behandlungsgruppen 7 Wochen nach TAC-OP signifikant erhöht vorlag, bekräftigt (Abbildung 30). Zusammenfassend konnte insbesondere aufgrund ungünstig gewählter Nachbeobachtungszeiträume nur ein Trend für eine 4-MU-vermittelte Inhibition der HA-Synthese mittels HABP-Färbung gezeigt werden.

Zur Validierung dieser Ergebnisse wurde HA im Blutserum der Versuchstiere mittels HABP *Sandwich* ELISA-ähnlichem Assay gemessen. Kuipers *et al.* belegten unter Anwendung dieser Methode, dass die 4-MU-vermittelte Inhibition der HA-Synthese nach einer 7-tägigen Fütterung systemisch nachweisbar ist. Sie zeigten eine starke Reduktion der HA-Plasmakonzentrationen um etwa 50% unter basalen Bedingungen [87]. Im Gegensatz dazu, wurde in der vorliegenden Arbeit die Plasmakonzentration nach 10-tägiger 4-MU-Fütterung sowie 3 Tage nach TAC-OP ($2209 \pm 294,2$ ng/mg) gemessen, die keinen Unterschied zur unbehandelten Kontrollgruppe ($2214 \pm 303,9$ ng/mg) ergab (Abbildung 29). Möglicherweise stellt der operative Eingriff *per se* einen so starken Stimulus zur Induktion der HA-Synthese dar, der sogar in scheinoperierten Tieren ausgeprägt ist (Abbildung 28) [129], dass die 4-MU-vermittelte Inhibition dadurch überdeckt wird.

4.2.4 4-Methylumbelliferon-vermittelte Effekte auf das kardiale *Remodeling* nach chronischer Druckbelastung sowie auf die Herzfunktion

Trotz des fehlenden Nachweis einer 4-MU-vermittelten Inhibition der HA-Synthese, wurde eine Reduktion des zellulären (um 19,8 % bei Betrachtung der kardiomyozytären Querschnittsfläche) sowie des globalen Hypertrophie-Grads (um 16,0 % bei Betrachtung des Verhältnisses von Herz- zu Körpergewicht) 7 Wochen nach TAC-OP beobachtet (Abbildung 33). Auf Grundlage unserer Daten ist allerdings nur von einer Reduktion und nicht von einer vollständigen Hemmung der Hypertrophie-Antwort auszugehen. Die 4-MU-behandelten Mäuse zeigten mit einem durchschnittlichen Feuchtherzgewicht von $162,1 \pm 5,87$ mg im Vergleich zu scheinoperierten Mäusen ($106,1 \pm 5,19$ mg, Appendix, Abbildung 46) dennoch einen Hypertrophie-Phänotyp. Grossman *et al.* beschrieben das hypertrophische *Remodeling* als kompensatorische Maßnahme, die durch eine Wandverdickung zu einer Reduktion der ventrikulären Wandspannung und einer Entlastung des Herzens beiträgt [6, 7]. Eine komplette Inhibition der Hypertrophie-Entwicklung wäre daher im Gegensatz zu einer Reduktion der Hypertrophie hämodynamisch nicht von Vorteil. In anderen Mausmodellen nach chronischer Druckbelastung wurde die linksventrikuläre Hypertrophie durch eine genetische Manipulation (myokardiale Überexpression des G-Proteins $G\alpha_q$ oder *Knock-out* des Dopamin- β -Hydroxylase-Gens) oder durch Behandlung mit Ciclosporin, einem Calcineurin-Blocker, reduziert. Die kontraktile Herzfunktion war im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe verbessert und es ergab sich keine erhöhte Mortalität [144, 145]. Im Hinblick auf unsere funktionellen Daten erhoben durch echokardiografische Untersuchungen, wurde ein begünstigter 4-MU-vermittelter Effekt auf die systolische Herzfunktion festgestellt. Dieser äußerte sich insbesondere 2 Wochen nach TAC-OP durch eine signifikant erhöhte Verkürzungsfraction (Abbildung 32). Es wurde zudem auch eine signifikant erniedrigte Sterblichkeit nach 4-MU-Behandlung dokumentiert (Abbildung 27). Diese Daten deuten also darauf hin, dass eine reduzierte Hypertrophie-Entwicklung in unserem Versuchsmodell einen positiven Effekt auf die Herzfunktion und das Überleben ausübt.

Im Gegensatz zur Hypertrophie ist die vermehrte Fibrose des Myokards regelmäßig mit einer verschlechterten Hämodynamik assoziiert. Die Fibrose entsteht durch Bindegewebsvermehrung, insbesondere durch interstitielle Ablagerung von Kollagen. Unter Behandlung mit 4-MU wurde in dieser Arbeit nach TAC eine signifikante Reduktion der interstitiellen und perivaskulären Fibrose festgestellt (Abbildung 34). Im Kontext der chronischen Druckbelastung geht die kardiale Fibrose mit einer erhöhten Steifigkeit und somit auch mit einer gestörten Relaxationsfähigkeit des Herzens einher. Dies kann schließlich in eine ventrikuläre Dilatation sowie eine diastolischen Dysfunktion münden [146]. Eine Reduktion

Diskussion

der kardialen Fibrose wäre daher wünschenswert. Ähnlich unserem Hypertrophie-Modell wurde in spontan hypertensiven Ratten und im Rahmen einer klinischen Studie mit Bluthochdruck-Patienten eine reduzierte Fibrose unter Behandlung mit dem ACE-Hemmer Lisinopril festgestellt, die zudem mit einer verbesserten diastolischen Herzfunktion assoziiert war [147, 148]. Die Schlussfolgerung, dass eine reduzierte Fibrosierung des Herzgewebes mit einer verbesserten Herzfunktion und einer höheren Überlebenschancen einhergeht, sollte jedoch nicht pauschalisiert werden. Im Kontext von anderen Herz-Kreislaufkrankungen, insbesondere in der akuten Phase nach Myokardinfarkt, wurde beschrieben, dass die sogenannte *replacement fibrosis* im ischämischen Teil des Herzens dem Verlust von atrophierten Kardiomyozyten kompensiert [149]. Die Kollagenfasern verleihen der Narbe Stabilität und eine reduzierte Synthese oder gestörte Vernetzung der Kollagenfasern erhöhen erheblich das Risiko einer Herzruptur [150]. In unserem Hypertrophie-Mausmodell waren jedoch keine Hinweise für ein erhöhtes Risiko einer Herzruptur erkennbar. Bei Betrachtung des diastolischen linksventrikulären Innendurchmessers 7 Wochen nach TAC-OP (Abbildung 32 B) war kein Hinweis auf eine verstärkte Dilatation in der 4-MU-behandelten Gruppe gegeben. Im Gegenteil, die reduzierte Fibrose ging mit einer verbesserten Herzfunktion (Abbildung 32 D und E) und einer erhöhten Überlebenschancen (Abbildung 27) einher. Diese Befunde untermauern die Hypothese, dass ein moderater Aufbau einer kollagenreichen Matrix ausreichend ist, um dem erhöhten Wandstress während chronischer Druckbelastung entgegenzuwirken, während eine übermäßige Fibrosierung zu einer systolischen und diastolischen Dysfunktion des Herzens beiträgt [151].

Warum eine 4-MU-vermittelte Hemmung der HA-Synthese den Fibrose- und Hypertrophie-Grad reduziert und die kontraktile Herzfunktion verbessert, ist ungeklärt. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass inflammatorische Prozesse während chronischer Druckbelastung maßgeblich an der Aktivierung von Fibroblasten und somit an der Pathogenese der kardialen Fibrose beteiligt sind [152]. Im nächsten Abschnitt werden deshalb unsere Befunde aus der Immunzell-Analyse im Herzen und im Blut 4-MU-behandelter Tiere nach TAC im Kontext der aktuellen Literatur diskutiert.

Zusammenfassend bietet die 4-MU-Behandlung zur Modulation des HA-Systems viele Vorteile hinsichtlich der Spezifität für die HA-Synthese-Hemmung und dem günstigen Nebenwirkungsprofil nach einem erprobten Fütterungsmodell. Der reduzierte Hypertrophie- und Fibrose-Grad im Herzen von 4-MU-behandelten Mäusen ging zudem mit einer verbesserten Herzfunktion und einer erniedrigten Sterblichkeit einher. Der zugrunde liegende Mechanismus ist allerdings noch nicht entschlüsselt.

4.3 Rolle von Immunzellen während des myokardialen *Remodeling*

Die Charakterisierung des immunologischen Phänotyps nach operativer Aortenstenose war für unsere Arbeitshypothese aus zweierlei Gründen wichtig. Einerseits berichteten zahlreiche Studien in den letzten Jahren über einen Zusammenhang von Inflammationsprozessen und dem myokardialen *Remodeling* nach chronischer Druckbelastung [152-156]. Diese postulieren eine maßgebliche Beteiligung von aktivierten Immunzellen an der Pathogenese myokardialer Hypertrophie. Auch in dieser Arbeit wurde 3 Tage nach TAC-OP in unbehandelten Kontrollmäusen eine signifikant oder annähernd signifikant erhöhte Expression zahlreicher Entzündungsmarker im Herzgewebe beobachtet (Abbildung 35). Diese Genexpressionsanalysen 4-MU-gefütterter Mäuse wurden mit den Ergebnissen scheinoperierter Kontrollmäuse verglichen, um auszuschließen, dass die beobachteten Expressionsänderungen auf ein Operationstrauma zurückzuführen waren. Außerdem wurde mittels durchflusszytometrischer Analysen gezeigt, dass in beiden Gruppen die TAC-OP zu einer Erhöhung zirkulierender Immunzellen myeloiden Ursprungs (Abbildung 41 C und E), insbesondere von Monozyten und Neutrophilen (Abbildung 43 A und B), führte und damit eine Immunreaktion induzierte. Diese Befunde bekräftigten die Annahme, dass in unserem Versuchsmodell inflammatorische Prozesse von pathologischer Bedeutung sein können. Andererseits gilt der HA-Synthese-Hemmer 4-MU als immunmodulatorische Substanz [90]. Insbesondere bei T-Zell-vermittelten Autoimmunkrankheiten, wie dem Typ-1-Diabetes, in der die HA als pro-inflammatorisches Signalmolekül agiert, wirkt sich die Anwendung von 4-MU günstig auf den Krankheitsverlauf aus [138, 139]. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls ein systemischer Effekt auf die zirkulierenden Immunzellen präoperativ nach 7-tägiger 4-MU-Behandlung beobachtet. So war der prozentuale Anteil der T-Lymphozyten, insbesondere der T-Helferzellen und der zytotoxischen Zellen (Abbildung 42 B, C und D), signifikant erniedrigt, während der Anteil der myeloiden Zellen entsprechend erhöht war (Abbildung 41 E). Diese relativen Verschiebungen in den zirkulierenden Immunzellpopulationen traten bereits präoperativ nach 7-tägiger 4-MU-Fütterung auf, sodass die beobachteten Unterschiede hinsichtlich der postoperativen Immunreaktionen im Herzen teilweise darauf zurückgeführt werden können.

4.3.1 Bedeutung der zirkulierenden Monozyten

Ein signifikanter Anstieg der zirkulierenden Zellen myeloiden Ursprungs war im zeitlichen Verlauf nach TAC-OP in beiden Gruppen vorhanden. Diese Zellen werden hauptsächlich in Neutrophile und Monozyten unterteilt. Bei den Neutrophilen ergaben sich unter 4-MU-Behandlung keine signifikante Unterschiede (Abbildung 43 A). Bei Betrachtung der

Diskussion

Zellzahlen für die Monozyten war jedoch auffällig, dass lediglich in der Kontrollgruppe ein Anstieg 3 Tage nach TAC-OP evident war, während der Anstieg in der 4-MU-Gruppe keine statistische Signifikanz aufwies (Abbildung 43 B). Um diesen Befund näher zu charakterisieren, wurden die Monozyten auf Grundlage der Expressionsstärke ihres Oberflächen-Antigens Ly6C unterteilt. Sie werden als *low*, *intermediate* oder *high* klassifiziert, denen gemäß Fachliteratur unterschiedliche Funktionen beigemessen werden. Aus der Herzinfarktforschung ist bekannt, dass Ly6C^{high}-Monozyten kurz nach Ischämie in das Herzgewebe einwandern und dort aufgrund ihrer proteolytischen und phagozytotischen Eigenschaften eine pro-inflammatorische Funktion ausüben [157, 158]. Im Gegensatz dazu, finden sich Ly6C^{low}-Monozyten erst mit einer 3-tägigen Verzögerung im Infarktgebiet und fördern die Heilungsphase indem sie Angiogenese, die Vermehrung von Myofibroblasten sowie die Akkumulation von Kollagenfasern begünstigen [157-160]. Im Rahmen der Heilungsphase werden diesen Immunzellen anti-inflammatorische Eigenschaften zugesprochen [158, 161-163]. Im Kontext des myokardialen *Remodeling* nach operativer Aortenstenose ist die Datenlage bzw. die Interpretation der Daten relativ kontrovers. Patel *et al.* postulierten einen Anstieg von Ly6C^{high}-Monozyten im Blut, die maßgeblich an der T-Zell-Aktivierung beteiligt sein sollen, während Weisheit *et al.* vor allem den Ly6C^{low}-Monozyten eine größere Bedeutung beigemessen haben [19, 164]. Letzterer zeigte, dass im zeitlichen Verlauf nach TAC-OP insbesondere eine Akkumulation von Ly6C^{low}-Makrophagen am Endothel des Herzens nachweisbar war und schlussfolgerte, dass Ly6C^{low}-Zellen maßgeblich die Immunantwort während der Hypertrophie-Stimulation vermitteln [164].

Auch in unserem Versuchsmodell wurde 3 Tage nach TAC-OP ein signifikanter Anstieg der zirkulierenden Ly6C^{low}-Monozyten im Vergleich zum präoperativen Zeitpunkt für beide Gruppen nachgewiesen (Abbildung 43 C). Interessanterweise war der Anstieg der Ly6C^{low}-Zellen in der 4-MU-Gruppe weniger stark ausgeprägt, da die Gesamtzellzahl signifikant niedriger war im Vergleich zur Kontrollgruppe. Daher kann die nicht erhöhte Gesamtzellzahl der zirkulierenden Monozyten im zeitlichen Verlauf nach TAC-OP (Abbildung 43 B) auf die postoperativ signifikant erniedrigten Ly6C^{low}-Monozyten zurückgeführt werden.

Fraglich bleibt, wodurch die beobachteten Unterschiede in den Immunzellpopulationen nach einer 4-MU-Behandlung hervorgerufen wurden? Möglicherweise ist die Bildung, Aktivierung oder Expansion bestimmter Subpopulationen unter 4-MU-Gabe gehemmt oder begünstigt. Alternativ wäre auch eine Störung der Rekrutierung im Herzen nach TAC-OP durch eine 4-MU-Behandlung denkbar, sodass im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe weniger Monozyten am Endothel des Herzens adhären. Diese nicht-rekrutierten Zellen könnten dann stets in der durchflusszytometrischen Analyse des Blutes erfasst werden und somit einen erhöhten Anteil im Blut repräsentieren. Im Falle einer gestörten Rekrutierung unter

einer 4-MU-Behandlung würde man zudem eine verminderte Makrophagen-Infiltration erwarten, da dieser Zelltyp zum größten Teil aus rekrutierten Monozyten hervorgeht [165].

4.3.2 Bedeutung der Makrophagen im Herzen

Interessanterweise ist in der Literatur, insbesondere für Makrophagen, eine bedeutende Funktion in Tiermodellen nach chronischer Druckbelastung beschrieben. Es wurde gezeigt, dass sich eine gezielte Depletion der Makrophagen, beispielsweise durch Verwendung von Clodronat-Liposomen, günstig auf das Ausmaß der Entwicklung von Hypertrophie und Fibrose sowie auf die Herzfunktion nach chronischer Druckbelastung auswirkt [18, 19]. Außerdem wurde in weiteren Mausstudien belegt, dass von Monozyten-abstammende Makrophagen nach kardialer Schädigung pro-inflammatorische Zytokine (zum Beispiel TNF- α) und Chemokine (zum Beispiel CCL2 oder CCL7) ausschütten [19] und diese die Entwicklung einer Fibrose fördern können [166, 167]. Auch in dieser Arbeit wurde ein starker Trend hinsichtlich einer erhöhten *Ccl2*-Expression 3 Tage nach TAC-OP in unbehandelten Kontrollmäusen (~ 25-fach erhöht im Vergleich zu scheinoperierten Mäusen, $p = 0,1099$ bei $n = 5 - 11$) beobachtet (Abbildung 35 A). Unter 4-MU-Behandlung schien die *Ccl2*-Expression 7 Wochen nach TAC-OP dagegen reduziert (~ 0,5-fach erniedrigt, $p = 0,0757$ bei $n = 13$) (Appendix, Abbildung 50 A).

Diese Befunde dienen im Rahmen unseres Versuchsmodells als erster Hinweis für eine reduzierte Makrophagen-Aktivität nach 4-MU-Behandlung. Daher wurde mittels Mac-2-Färbung die Makrophagen-Infiltration immunhistochemisch untersucht. Mac-2 ist ein spezifischer Marker für aktivierte Makrophagen, der als diagnostischer Marker für kardiale Fibrose in Herzinsuffizienz-Patienten empfohlen wurde [168]. Unter basalen Bedingungen ist im gesunden Herzen keine *Mac-2*-Expression nachweisbar, erst nach kardialer Schädigung wird dessen Expression induziert und erreicht im Falle einer TAC-OP nach 7 Tagen ein Maximum [48, 169]. In einem Hypertrophie-Modell wurde zudem gezeigt, dass Mac-2 (auch bekannt als Galectin-3) die Proliferation kardialer Fibroblasten, eine erhöhte Kollagen-Produktion und eine linksventrikuläre Dysfunktion vermittelt [170]. Unsere Versuche haben gezeigt, dass 4-MU bereits 3 Tage nach TAC-OP die Signale für Mac-2 im Herzgewebe reduziert, entsprechend einer reduzierten Makrophagen-Infiltration (Abbildung 36). Um die Subpopulationen der Makrophagen näher zu charakterisieren, erfolgte 3 Tage nach TAC-OP zudem eine durchflusszytometrische Analyse des Herzens. Grundsätzlich wurden keine signifikanten Unterschiede für die Gesamtzellzahlen der betrachteten Subgruppen der Leukozyten nachgewiesen (Abbildung 38, Abbildung 39). Interessanterweise wurde jedoch ein starker Trend hinsichtlich einer verringerten Zellzahl von Ly6C^{low}-Makrophagen ($p = 0,0932$) in der 4-MU-Gruppe sichtbar (Abbildung 40 A). Wahrscheinlich ist dies eine

Diskussion

Folge der signifikant reduzierten Ly6C^{low}-Monozyten im Blut 4-MU-behandelter Tiere (Abbildung 43 C).

Weiterhin zeigte sich eine annähernd signifikant reduzierte Zellzahl von MHCII-positiven Makrophagen ($p = 0,0807$) im Herzen (Abbildung 40 D). Zusammen mit den Daten für die Ly6C^{low}-Makrophagen im Herzen (Abbildung 40 A) bestärken sie die den Befund einer signifikant reduzierten Makrophagen-Infiltration, die zuvor durch immunhistochemische Mac2-Färbung gezeigt wurde. Mögliche Gründe für die fehlende statistische Signifikanz der durch Durchflusszytometrie erhobenen Daten im Gegensatz zur histologische Untersuchung sind, dass bei den Versuchen für die Durchflusszytometrie das gesamte Herzgewebe untersucht wurde, wohingegen bei der histologischen Untersuchung nur eine Schnittebene im Herzen und nur ein Oberflächenmarker (Mac2) berücksichtigt wurde. Im Gegensatz dazu wurden zur Charakterisierung der in der Durchflusszytometrie untersuchten Makrophagen 5 verschiedene Oberflächenmarker betrachtet (CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁻ F4/80⁺ Ly6C bzw. MHCII⁺), sodass die gemessene Makrophagen-Population relativ stringent charakterisiert wurde.

Ein reduzierter Anteil der MHCII-positiven Makrophagen (Abbildung 40 D) könnte eine verminderte T-Zell-Aktivierung zur Folge haben, da für diese Zellen gezeigt wurde, dass sie der Antigenpräsentation für T-Zellen dienen, wohingegen MHCII-negativen-Makrophagen phagozytotische Eigenschaften zugesprochen werden [163]. In diesem Zusammenhang wurde ein Trend hinsichtlich einer geringeren Lymphozytenzahl im Herzen nach 4-MU-Behandlung beobachtet ($p = 0,1543$) (Abbildung 38 B). Allerdings kann aufgrund der verwendeten Zellmarker in der durchflusszytometrischen Analyse des Herzens nicht bestimmt werden, ob es sich dabei um T-Zellen handelt. Wenn dem so wäre, würden diese Daten gut mit der durchflusszytometrischen Analyse des Blutes korrelieren, in der präoperativ eine signifikante Reduktion des prozentualen Anteils von T-Zellen (T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen) auffällig war (Abbildung 42 B, C und D). In anderen Mausstudien wurde gezeigt, dass T-Zellen während des myokardialen *Remodeling* nach chronischer Druckbelastung von hoher Bedeutung sein können. Die Inaktivierung von T-Zellen unter Verwendung T-Zell-spezifischer Antikörper oder indirekt durch Hemmung Antigen-präsentierender Makrophagen verringerten die Entwicklung von Hypertrophie und Fibrose des Herzens [2, 19, 171].

Im nächsten Abschnitt werden die hier gewonnenen Erkenntnisse und Ergebnisse in einem möglichen Modell zusammengefasst.

4.4 Potentielles Modell

Auf Grundlage der in dieser Arbeit erhobenen Daten und der zuvor herausgearbeiteten Erkenntnisse aus der Herzforschung wird ein Modell, das die 4-MU-Behandlung in einem Mausmodell nach chronischer Druckbelastung mit dem beobachteten Phänotyp in einem kausalen Zusammenhang darstellt, postuliert. Es ist in Abbildung 44 skizziert und nachfolgend beschrieben.

Das Herz während chronischer Druckbelastung reagiert in der Akutphase nach operativer Aortenstenose mit dem Aufbau einer HA-reichen EZM, die durch eine signifikant erhöhte Genexpression von *Has2* induziert wird (Abbildung 19). In der Fachliteratur liegt gesichert vor, dass die Applikation von 4-MU eine systemische Inhibition der HA-Synthese zur Folge hat [87]. Dieser beschriebene 4-MU-vermittelte Effekt wurde durch Untersuchung des Herzgewebes 3 Tage nach TAC-OP mit einem Trend hinsichtlich einer verminderten HA-Synthese nach 4-MU-Behandlung bestärkt (Abbildung 28). Durch die verminderte HA-Synthese ist gemäß dem Modell die Aktivierung, Proliferation, Differenzierung, Überleben, Migration und Funktion vieler Immunzellen, wie etwa den T-Zellen, reduziert [172]. Die pro-inflammatorische Wirkung von HA wird insbesondere bei Betrachtung von *knockout*-Mäusen für den HA-Rezeptor CD44 deutlich [173]. Die Aktivierung des CD44-Rezeptors vermittelt unter anderem die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen aus zirkulierenden Monozyten, die insbesondere durch LMW-HA stimuliert werden [174, 175]. Ein wichtiges Zytokin ist in diesem Zusammenhang Interleukin-1 β , das hauptsächlich aus aktivierten Monozyten sezerniert wird. Unter 4-MU-Behandlung war in den Versuchen der vorliegenden Arbeit die Expression von Interleukin-1 β um >50 % verringert (Appendix, Abbildung 50 A). Dieser Befund stellt einen Hinweis auf eine reduzierte Signaltransduktion des CD44-Rezeptors und eine konsekutiv unter 4-MU verringerte Monozyten-Aktivierung dar.

Daher könnten über das reduzierte CD44-*signaling* weniger aktivierte Monozyten, die als Vorläuferzellen von Makrophagen dienen, zum Herzen rekrutiert werden und ins Gewebe migrieren. So war 3 Tage nach TAC-OP unter 4-MU-Behandlung die Makrophagen-Infiltration im Herzen reduziert (Abbildung 36). Bestärkt wurde dieser Befund durch die durchflusszytometrischen Analysen, die einen starken Trend hinsichtlich einer verringerten Zellzahl von Ly6C^{low}-Makrophagen darstellten.

Das gestörte CD44-*signaling* unter 4-MU könnte ferner die Antigenpräsentation von Makrophagen zur Aktivierung von T-Zellen stören, denn der Anteil der zirkulierenden T-Zellen war in den 4-MU-behandelten Tieren signifikant reduziert (Abbildung 42 B). Im Herzgewebe 3 Tage nach TAC-OP wurde außerdem noch ein Trend hinsichtlich weniger Lymphozyten nach 4-MU-Behandlung beobachtet. Ferner war die Gesamtzellzahl der MHCII-positiven Makrophagen, die für T-Zellen als Antigen-präsentierende Zellen agieren, annähernd signifikant verringert (Abbildung 40 D).

Diskussion

Zur Rekrutierung weiterer Immunzellen schütten Makrophagen nach Aktivierung pro-inflammatorische Chemokine aus, wie zum Beispiel CCL2 [19]. Passend dazu zeigte die vorliegende Arbeit einen deutlichen Trend hinsichtlich einer erhöhten *Ccl2*-Expression nach TAC-OP (Abbildung 35 A), die nach chronischer Druckbelastung durch langzeitige 4-MU-Gabe annähernd signifikant verringert wurde ($p = 0,0757$) (Appendix, Abbildung 50 A). Dieser Befund stellt ein weiteres Indiz für eine verringerte Aktivierung von Makrophagen unter 4-MU-Behandlung dar. Für viele Chemo- und Zytokine, so auch CCL2, ist bekannt, dass sie nicht nur eine pro-inflammatorische sondern auch eine pro-fibrotische Wirkung ausüben durch Aktivierung von Fibroblasten [166, 167]. Der Makrophagen-spezifische Oberflächenmarker Mac-2 gilt sogar als diagnostischer Marker für kardiale Fibrose bei Herzinsuffizienz-Patienten. Dieser Zusammenhang zwischen Makrophagen-Infiltration und Fibrose-Entwicklung zeigte sich auch nach TAC-OP, denn die verringerte Makrophagen-Infiltration (Abbildung 36) ging mit einer einem reduzierten Kollageneinlagerung (Abbildung 34) des Myokards einher [168].

Ein weiterer Hauptbefund unserer Mausstudie war die Beobachtung einer signifikant reduzierten Hypertrophie-Entwicklung auf zellulärer Ebene, die sich auch in einem reduzierten Herzgewicht zeigte (Abbildung 33). Es ist bekannt, dass kardiale Fibroblasten nach TAC-vermittelter TGF- β -Stimulation verschiedene Wachstumsfaktoren sezernieren. Hier zu nennen ist der *fibroblast growth factor-2* (FGF-2), der den MAPK-Signalweg in Kardiomyozyten aktiviert [176, 177], und der *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), der den PI3K / Akt / *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) Signalweg induziert [178]. Diese Signalwege sind maßgeblich in der Hypertrophie-Entwicklung von Kardiomyozyten beteiligt. Es wäre daher möglich, dass die in unserem Modell beobachtete reduzierte Fibrose in einem kausalen Zusammenhang mit der verminderten Hypertrophie-Entwicklung steht.

Schließlich wurde auch ein positiver 4-MU-vermittelter Effekt auf die kontraktile Herzfunktion 2 Wochen nach TAC-OP festgestellt, der insbesondere durch eine Erhöhung des Geschwindigkeitszeit-Integrals, einem Parameter für das Herzzeitvolumen, sowie einer Erhöhung der Verkürzungsfraction in Erscheinung trat (Abbildung 32 D und E). Die Verkürzungsfraction wird auf Grundlage der Messdaten für die linksventrikulären endsystolischen und enddiastolischen Innendurchmesser bestimmt. Auffällig war, dass lediglich die endsystolischen Durchmesser nach 4-MU-Behandlung signifikant verringert waren. Im Gegensatz dazu waren die enddiastolischen Durchmesser beider Gruppen unverändert, obwohl die Herzgröße der 4-MU-behandelten Mäuse, einhergehend mit einem reduzierten Herzgewicht, kleiner war als die der Kontrollgruppe. Daher kann unser Befund der erhöhten Verkürzungsfraction unter 4-MU-Behandlung nicht unbedingt auf eine verbesserte Kontraktilität zurückgeführt werden sondern könnte auch durch eine verbesserte Relaxationsfähigkeit der Herzen begründet werden. In diesem Fall kann die reduzierte

Diskussion

Fibrose unter 4-MU-Behandlung als mögliche Ursache angeführt werden. Yamamoto *et al.* wiesen nach, dass die kardiale Fibrose ursächlich für eine erhöhte Steifigkeit des Herzens ist [179]. Eine Reduktion des Fibrose-Grads verbessert also demnach die Relaxationsfähigkeit des Herzens nach TAC und trägt somit zur Aufrechterhaltung des benötigten Herzzeitvolumens bei.

Möglicherweise besteht aufgrund des mildereren myokardialen *Remodeling* während einer 4-MU-Behandlung weniger Kompensationsbedarf der Kardiomyozyten, sodass die systolische und diastolische Herzfunktion nach TAC-OP weniger stark beeinträchtigt ist. Dennoch bedarf es weiterer Forschungsarbeit zur Identifikation des zugrundeliegenden Mechanismus für den hier beobachteten Phänotyp. Das nachfolgende Schaubild fasst das hier vorgeschlagene Modell zusammen (Abbildung 44).

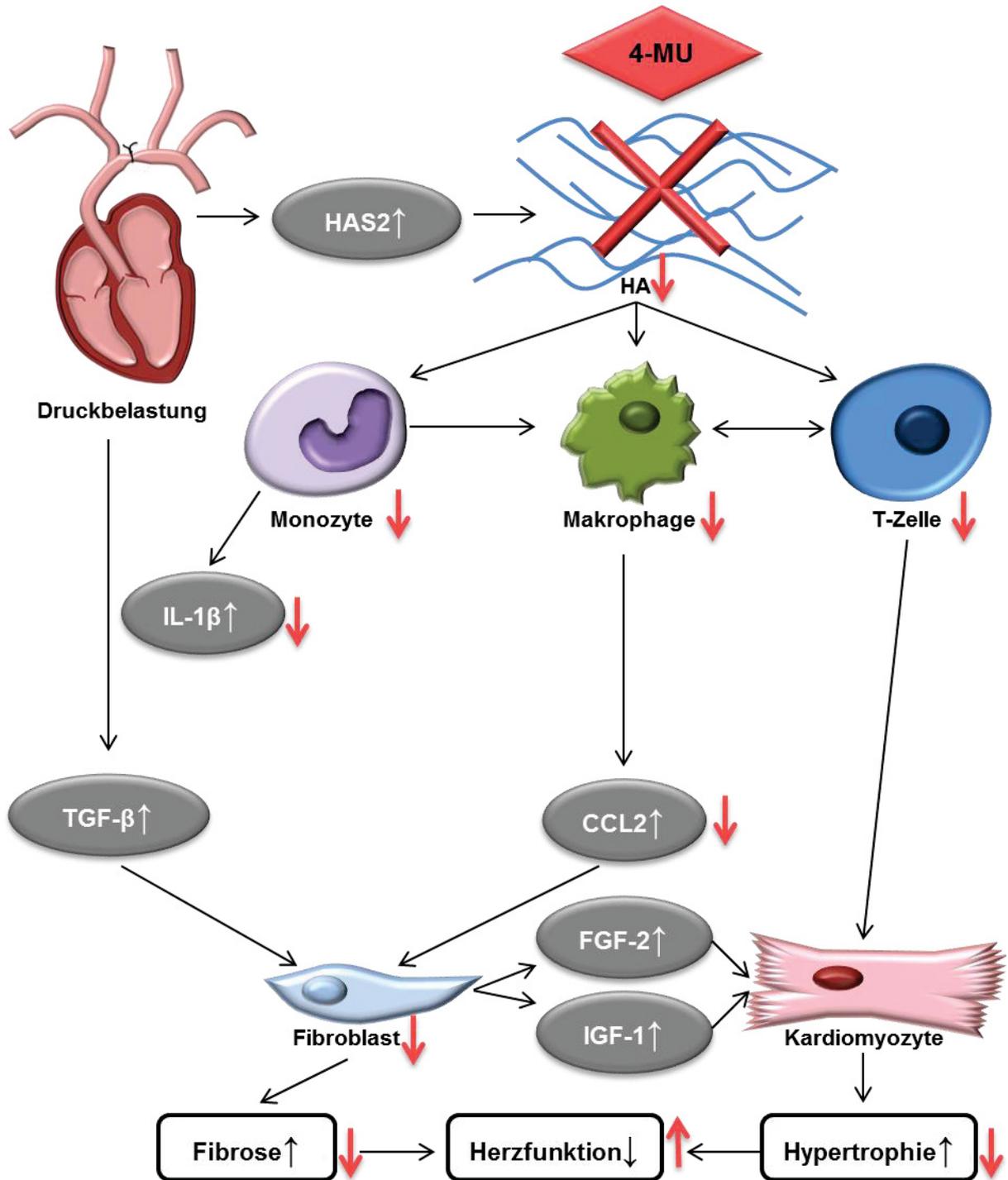


Abbildung 44: Schaubild eines Modells für den zugrundeliegenden Mechanismus von 4-Methylumbelliferon (4-MU) nach chronischer Druckbelastung. Die durch die operative Aortenstenose verursachte chronische Druckbelastung führt zu einer Induktion der *Has2*-Genexpression. Damit wird der Aufbau einer Hyaluronsäure (HA)-reichen Extrazellulärmatrix begünstigt. Eine 4-MU-Behandlung hemmt die HA-Synthese. Somit wird das CD44-vermittelte HA-signaling in Immunzellen reduziert, sodass weniger Zyto- und Chemokine (IL-1 β und CCL2) ausgeschüttet werden und die T-Zell-Expansion langfristig inhibiert wird. Die Fibroblasten-Aktivierung wird in Folge dessen gehemmt, die durch eine reduzierte Fibrose-Entwicklung in Erscheinung tritt. Die Fibroblasten sezernieren demnach weniger Wachstumsfaktoren (FGF-2 und IGF-2), die eine Hypertrophie-Entwicklung in Kardiomyozyten induzieren. Das moderate myokardiale *Remodeling* unter 4-MU-Behandlung wirkt sich günstig auf die Herzfunktion aus.

4.5 Schwierigkeiten im Verlauf der Arbeit und mögliche Limitationen

4.5.1 Wechsel des Hypertrophie-Modells

Als Hypertrophie-Modell wurden im Rahmen der Vorstudie für die Transkriptom- und Proteom-Analyse transgene VM/RC-Mäuse verwendet, die nach Blankenburg *et al.* eine ausgeprägte HCM modellieren (1.1.3.2) [35]. Aufgrund der erhöhten Sterblichkeit der VM/RC-Mäuse vor und nach 2013 (Abbildung 17) war die Notwendigkeit gegeben, das Modell zu wechseln. Die Ursachen für die erhöhte Sterblichkeit können sehr vielfältig sein. Hier zu nennen sind unterschiedliche Haltungsbedingungen in Würzburg (von 2009 bis 2012) und Düsseldorf (nach 2012).

Eine weitere Möglichkeit stellen zufällige genetische Veränderungen in der Mauslinie dar (genetischer *drift*). Gerade bei HCM kann selbst ein Austausch von einzelnen Aminosäuren (Punktmutationen), der *per se* keinen Herzphänotyp verursacht, in Kombination mit einer HCM-verursachenden Mutation das Krankheitsbild deutlich verstärken [35]. Um einen derartigen genetischen *drift* als Ursache für den veränderten Herzphänotyp der VM/RC-Mäuse zu identifizieren bzw. auszuschließen, könnte diese Linie aus kryokonservierten Embryos der Linie RC und VM neu generiert werden. Die Rederivierung und Kreuzung der Linien würde allerdings mindestens 8 Monate in Anspruch nehmen. Da aus der Würzburger Zucht nur noch sehr wenige kryokonservierte Embryos existieren, wäre ein Erfolg der Rederivierung ungewiss. Ferner könnte nicht vorhergesagt werden, ob diese Strategie tatsächlich die Sterblichkeit der VM/RC-Mäuse reduzieren würde. Die initialen Analysen des kardialen Transkriptoms und Proteoms wurden mit VM/RC-Herzen der Würzburger Zucht durchgeführt. Die dabei erhobenen Daten wurden daher als potentiell relevant für die Pathogenese der HCM eingestuft werden. Weiterführende Untersuchungen konnten dagegen aufgrund der beschriebenen Frühsterblichkeit der VM/RC-Mäuse nicht mehr mit dieser Linie durchgeführt werden.

In Absprache mit dem Erstbetreuer der vorliegenden Arbeit wurde daher entschieden, das laufende Projekt mit einem anderen Modell für kardiale Hypertrophie fortzusetzen. Die operative Aortenstenose stellte als etabliertes Modell zur Untersuchung von Hypertrophie-Entwicklung eine gute Alternative dar. Es bietet den Vorteil, dass es ähnlich wie der arterielle Hypertonus, von der laut Weltgesundheitsorganisation über 20 % der Bevölkerung betroffen sind und der als Hauptursache für die Entwicklung einer Hypertrophie gilt, zu einer chronischen Druckbelastung des Herzens führt [4]. Sie simuliert damit ein häufiges klinisches Problem. Im Gegensatz dazu, stellt die HCM mit einer Prävalenz von 1:500 eine vergleichsweise seltene Erkrankung dar [3].

4.5.2 Pleiotrope Effekte von 4-Methylumbelliferon

Im Rahmen der Vorstudie an VM/RC-Herzen wurde die HA als mögliches Schlüsselmolekül während des hypertrophischen *Remodeling* ausgewählt. Um dessen Rolle im Hypertrophie-Mausmodell zu untersuchen und zu charakterisieren, wurde die HA-Synthese durch 4-MU-Fütterung inhibiert.

Es gibt jedoch aus der Tumorforschung Hinweise auf eine pleiotrope HA-unabhängige Wirkungsweise von 4-MU. Darin ist beschrieben, dass 4-MU anti-proliferativ, anti-karzinogen, anti-angiogen, anti-fibrogen sowie anti-inflammatorisch wirkt. Ob diese Effekte nur durch eine Hemmung der HA-Synthese vermittelt sind, ist nicht vollständig geklärt [90].

Tamura *et al.* zeigten, dass unter 4-MU-Behandlung die Genexpression der Thymidin-Phosphorylase, die mit einer verschlechterten Prognose in Patientinnen mit Eierstockkrebs assoziiert ist [180], erniedrigt vorlag. Es wurde in diesem Zusammenhang spekuliert, dass 4-MU auf noch ungeklärte Weise den PI3K/Akt Signalweg inaktiviert, der mechanistisch nicht auf eine Hemmung der HA-CD44 Interaktion zurückzuführen ist [90, 181].

Der zugrundeliegende Mechanismus von 4-MU im Einsatz als Gallentherapeutikum ist ebenfalls nicht HA-vermittelt, sondern beruht auf einem erhöhten Transport der 4-MU-Metabolite aus der Galle. Daran ist der aktive Export von Natrium- und Kaliumionen gekoppelt und infolge des osmotischen Gradienten wird auch die passive Wasserausscheidung aus der Galle gefördert [81].

Im vorliegenden Projekt kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass HA-unabhängige Effekte zu dem beobachteten Herzphänotyp unter 4-MU-Behandlung beitragen. Eine Möglichkeit derartige pleiotrope Effekte auszuschließen, wäre durch die Verwendung von *Has*-defizienten Mäusen gegeben. Auf diese Weise wäre eine hochspezifische Inhibition der HA-Synthese möglich.

4.5.3 Gewichtsverlust unter 4-Methylumbelliferon

Gemäß dem Konsensus vieler Forschungsgruppen liegt gesichert vor, dass 4-MU die HA-Synthese in vielen verschiedenen Zell- sowie Tiermodell blockiert [86, 87, 89, 108-113]. Kuipers *et al.* beschrieben, dass vor allem in den ersten 7 Tagen nach Fütterungsbeginn die Tiere einen großen Gewichtsverlust erlitten. Das Körpergewicht wurde wöchentlich dokumentiert und war 7 Wochen nach 4-MU-Fütterung stets signifikant erniedrigt im Vergleich zur Kontrollgruppe [87].

In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Befund ebenfalls beobachtet (Abbildung 25). Durch entsprechende Gegenmaßnahmen im Sinne des körperrgewichtsadaptierten Fütterns der Kontrollgruppe wurde das durchschnittliche Körpergewicht beider Gruppen wieder

Diskussion

angeglichen. Auffällig war hierbei, dass 7 Wochen nach Fütterungsbeginn das ursprüngliche gemittelte Startgewicht von $28,27 \pm 0,43$ g (Kontrollgruppe) und $28,59 \pm 0,37$ g (4-MU-Gruppe) nicht wieder erreicht wurde. Eine strenge Kontrolle des Körpergewichts beider Behandlungsgruppen war für unsere Fragestellung von großer Bedeutung, da das Körpergewicht zur Normalisierung des Herzgewichts verwendet wurde und das Verhältnis beider Größen zur Beurteilung des Hypertrophie-Grads herangezogen wurde.

Um dem Gewichtsverlust teilweise entgegenzuwirken, wäre eine 4-MU-Gabe über eine Schlundsonde denkbar. Die intraperitoneale oder intravenöse Applikationsform wären dagegen aufgrund der hohen *Clearance* und der kurzen Halbwertszeit von 4-MU nicht praktikabel [87, 137].

Trotz des Gewichtsverlust waren die Herzen und die Myozyten unter einer Vorbehandlung mit 4-MU auch bei gewichtsbereinigter Auswertung kleiner und die Fibrose geringer. Ferner wurden eine bessere Herzfunktion sowie eine niedrigere Mortalität beobachtet.

Da in unserem Modell die Substanz 4-MU präventiv verabreicht wurde, könnte in nachfolgenden Mausstudien untersucht werden, ob sich eine postoperative 4-MU-Behandlung ebenfalls positiv auswirkt. Diese könnten dann als Grundlage für klinische Studien im Menschen dienen.

5. Zusammenfassung

Pathologische Hypertrophie beschreibt die krankhafte Vergrößerung des Herzens. Sie ist mit Umbauprozessen (*Remodeling*) - insbesondere der Entwicklung einer interstitiellen Fibrose des Myokards - assoziiert und führt häufig zu Einschränkungen der kardialen Pumpfunktion und Herzinsuffizienz. In einem genetischen Mausmodell für hypertrophische Kardiomyopathie wurden in der vorliegenden Arbeit mittels Transkriptom- und Proteom-Analysen deutliche Veränderungen in der Expression kardialer Gene bzw. der Abundanz kardialer Proteine festgestellt, die für Bestandteile der Extrazellulärmatrix (EZM) relevant sind. Da diese Befunde noch vor Einsetzen des pathologischen *Remodeling* erhoben wurden, war davon auszugehen, dass sie eher eine Ursache als eine Folge der Hypertrophie darstellten. Basierend auf dieser Vorstudie sowie Daten aus der Literatur wurde die Hypothese untersucht, dass die Hyaluronsäure (HA), ein Struktur- und Signalmolekül der EZM, eine wichtige Rolle für die Entstehung pathologischer Hypertrophie spielt.

Einen ersten Hinweis zur Bestätigung dieser Hypothese erbrachten zellkulturelle Untersuchungen einer Myoblasten-Zelllinie. Es stellte sich nämlich heraus, dass der HA-Synthese-Inhibitor 4-Methylumbelliferon (4-MU) das durch Isoprenalin induzierte Zellwachstum hemmt. *In vivo* wurde eine kardiale Hypertrophie in Mäusen durch Druckbelastung des linken Ventrikels infolge operativer Aortenstenosierung (TAC) induziert. Bereits drei Tage nach TAC war die Expression der Hyaluronsäure-Synthase 2 (*Has2*) im Herzgewebe > 6-fach angestiegen. Die langfristige Hemmung der HA-Synthese mittels 4-MU, das der Nahrung der Tiere beigemischt wurde, führte zu einer Reduktion der Hypertrophie-Antwort nach TAC. Histologische Untersuchungen zeigten außerdem geringere Kollagenablagerungen im Herzen 4-MU-behandelter Tiere. Interessanterweise war sowohl die interstitielle als auch die perivaskuläre Fibrose reduziert. Als mögliche Ursache für das mildere *Remodeling* konnten Veränderungen in der Entzündungsreaktion des Herzens identifiziert werden, insbesondere war die Infiltration mit Makrophagen aus dem Knochenmark während der ersten Tage nach TAC verringert. Ferner ergaben echokardiografische Messungen, dass 4-MU auch die kardiale Auswurfleistung erhöht. Innerhalb des Beobachtungszeitraums von sieben Wochen fielen außer einer initialen Gewichtsreduktion keine schwerwiegenden Nebenwirkungen der 4-MU-Behandlung auf. Die Überlebensrate der Tiere nach TAC war mit 4-MU sogar höher als in der unbehandelten Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse zeigen zum ersten Mal, dass die EZM - und speziell HA - von großer Bedeutung für das myokardiale *Remodeling* nach Hypertrophie-Stimulation durch chronische Druckbelastung ist. Analoge kardiale Umbauprozesse treten bei Menschen mit arterieller Hypertonie auf. Die hier erhobenen Befunde könnten eine Grundlage für klinische Studien sein mit dem Ziel die pathologische Hypertrophie-Entwicklung des Herzens einzudämmen.

6. Summary

Pathological hypertrophy describes the abnormal enlargement of the heart. It is associated with remodeling processes - especially the development of interstitial fibrosis of the myocardium - and frequently leads to impaired cardiac function and heart failure. The presented work identified significant changes in the expression of cardiac genes and the abundance of cardiac proteins of the extracellular matrix (ECM) in a genetic mouse model of hypertrophic cardiomyopathy using transcriptome and proteome analyzes. Since these findings were obtained before the onset of pathological remodeling, they were considered a cause rather than a consequence of cardiac hypertrophy. Based on this preliminary study and data from literature, we proposed that hyaluronic acid (HA), a structural and signaling molecule of the ECM, plays an important role in the development of pathological hypertrophy.

As a first step, this hypothesis was supported by cell culture experiments using a myoblast cell line. In fact, the inhibitor of HA synthesis, 4-methylumbelliferone (4-MU), turned out to inhibit isoprenaline-induced cell growth. *In vivo*, cardiac hypertrophy was induced in mice by left ventricular pressure overload due to transverse aortic constriction (TAC). Already three days after TAC, cardiac expression of HA synthase 2 (*Has2*) had increased > 6-fold. Long-term inhibition of HA synthesis by 4-MU, which was added to the mouse diet, reduced the hypertrophic response after TAC. Histological analyses further revealed decreased collagen deposition in the heart of 4-MU treated animals. Interestingly, both interstitial and perivascular fibrosis were reduced. Changes in the inflammatory response of the heart were identified as a possible reason for the milder cardiac remodeling. In particular, cardiac infiltration with bone marrow-derived macrophages was reduced during the first few days after TAC. In addition, echocardiographic measurements revealed that 4-MU also increases cardiac ejection fraction. No serious side effects of 4-MU were noticed within seven weeks of continuous treatment except for an initial body weight loss. The survival rate of animals after TAC was even higher in 4-MU-treated mice compared to an untreated control group.

These results show for the first time that the ECM - and particularly HA - is of great importance for myocardial remodeling after hypertrophic stimulation by chronic pressure overload. In humans, arterial hypertension induces comparable cardiac remodeling. The findings of the present work may provide a basis for clinical studies that aim to control the development of pathological cardiac hypertrophy.

Literaturverzeichnis

1. Shimizu, I. and T. Minamino, *Physiological and pathological cardiac hypertrophy*. J Mol Cell Cardiol, 2016. **97**: p. 245-62.
2. Kallikourdis, M., et al., *T cell costimulation blockade blunts pressure overload-induced heart failure*. Nature Communications, 2017. **8**: p. 14680.
3. Semsarian, C., et al., *New Perspectives on the Prevalence of Hypertrophic Cardiomyopathy*. Journal of the American College of Cardiology, 2015. **65**(12): p. 1249-1254.
4. Weltgesundheitsorganisation. *Raised blood pressure - Situation and trends*. 24.07.2018; Available from: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_pressure_text/en/.
5. Vakili, B.A., P.M. Okin, and R.B. Devereux, *Prognostic implications of left ventricular hypertrophy*. American Heart Journal, 2001. **141**(3): p. 334-341.
6. Nakamura, M. and J. Sadoshima, *Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy*. Nature Reviews Cardiology, 2018. **15**(7): p. 387-407.
7. Grossman, W., D. Jones, and L.P. McLaurin, *Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle*. J Clin Invest, 1975. **56**(1): p. 56-64.
8. Tham, Y.K., et al., *Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets*. Arch Toxicol, 2015. **89**(9): p. 1401-38.
9. Bernardo, B.C., et al., *Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies*. Pharmacology & Therapeutics, 2010. **128**(1): p. 191-227.
10. Frey, N. and E.N. Olson, *Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly*. Annu Rev Physiol, 2003. **65**: p. 45-79.
11. Hasenfuss, G., *Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure*. Cardiovasc Res, 1998. **37**(2): p. 279-89.
12. Schwinger, R.H., et al., *Reduced Ca(2+)-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(3): p. 479-91.
13. Taegtmeyer, H., *Switching metabolic genes to build a better heart*. Circulation, 2002. **106**(16): p. 2043-5.
14. Stanley, W.C. and M.P. Chandler, *Energy metabolism in the normal and failing heart: potential for therapeutic interventions*. Heart Fail Rev, 2002. **7**(2): p. 115-30.
15. Hue, L. and H. Taegtmeyer, *The Randle cycle revisited: a new head for an old hat*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **297**(3): p. E578-91.
16. Lopaschuk, G.D., et al., *Myocardial Fatty Acid Metabolism in Health and Disease*. Physiological Reviews, 2010. **90**(1): p. 207-258.
17. Takimoto, E. and D.A. Kass, *Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling*. Hypertension, 2007. **49**(2): p. 241-8.
18. Kain, D., et al., *Macrophages dictate the progression and manifestation of hypertensive heart disease*. International Journal of Cardiology, 2016. **203**: p. 381-395.
19. Patel, B., et al., *CCR2+ Monocyte-Derived Infiltrating Macrophages Are Required for Adverse Cardiac Remodeling During Pressure Overload*. JACC: Basic to Translational Science, 2018. **3**(2): p. 230-244.

20. Frieler, R.A. and R.M. Mortensen, *Immune Cell and Other Non-Cardiomyocyte Regulation of Cardiac Hypertrophy and Remodeling*. *Circulation*, 2015. **131**(11): p. 1019-1030.
21. Testa, M., et al., *Circulating Levels of Cytokines and Their Endogenous Modulators in Patients With Mild to Severe Congestive Heart Failure Due to Coronary Artery Disease or Hypertension*. *Journal of the American College of Cardiology*, 1996. **28**(4): p. 964-971.
22. Hoppe, U.C. and E. Erdmann, *[Guidelines for the treatment of chronic heart failure. Issued by the Executive Committee of the German Society of Cardiology--Heart and Circulation Research, compiled on behalf of the Commission of Clinical Cardiology in cooperation with Pharmaceutic Commission of the German Physicians' Association]*. *Z Kardiologie*, 2001. **90**(3): p. 218-37.
23. Conrad, C.H., et al., *Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat*. *Circulation*, 1995. **91**(1): p. 161-70.
24. American Heart Association, I. *What is Left Ventricular Hypertrophy (LVH)?* 06.08.2018; Available from: <https://www.heart.org/en/health-topics/heart-valve-problems-and-disease/heart-valve-problems-and-causes/what-is-left-ventricular-hypertrophy-lvh#.W1eSh8IyW9I>.
25. Linhart, A. and F. Cecchi, *Common presentation of rare diseases: Left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction*. *International Journal of Cardiology*, 2018. **257**: p. 344-350.
26. 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 J Heart Fail*, 2016. **18**(8): p. 891-975.
27. Savarese, G. and L.H. Lund, *Global Public Health Burden of Heart Failure*. *Cardiac Failure Review*, 2017. **3**(1): p. 7-11.
28. Peter, A.K., M.A. Bjerke, and L.A. Leinwand, *Biology of the cardiac myocyte in heart disease*. *Molecular Biology of the Cell*, 2016. **27**(14): p. 2149-2160.
29. Kimes, B.W. and B.L. Brandt, *Properties of a clonal muscle cell line from rat heart*. *Exp Cell Res*, 1976. **98**(2): p. 367-81.
30. Watkins, S.J., G.M. Borthwick, and H.M. Arthur, *The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2011. **47**(2): p. 125-31.
31. Garbern, J.C., C.L. Mummery, and R.T. Lee, *Model systems for cardiovascular regenerative biology*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013. **3**(4): p. a014019.
32. Elliott, P., et al., *Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases*. *Eur Heart J*, 2008. **29**(2): p. 270-6.
33. Alcalai, R., J.G. Seidman, and C.E. Seidman, *Genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy: from bench to the clinics*. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2008. **19**(1): p. 104-10.
34. Schmitt, J.P., et al., *Cardiac myosin missense mutations cause dilated cardiomyopathy in mouse models and depress molecular motor function*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. **103**(39): p. 14525-14530.

35. Blankenburg, R., et al., *beta-Myosin heavy chain variant Val606Met causes very mild hypertrophic cardiomyopathy in mice, but exacerbates HCM phenotypes in mice carrying other HCM mutations*. *Circ Res*, 2014. **115**(2): p. 227-37.
36. Bloemink, M., et al., *The hypertrophic cardiomyopathy myosin mutation R453C alters ATP binding and hydrolysis of human cardiac beta-myosin*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(8): p. 5158-67.
37. Watkins, H., et al., *Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy*. *N Engl J Med*, 1992. **326**(17): p. 1108-14.
38. Morimoto, S., *Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies*. *Cardiovasc Res*, 2008. **77**(4): p. 659-66.
39. Pettersen, E.F., et al., *UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis*. *J Comput Chem*, 2004. **25**(13): p. 1605-12.
40. Lompre, A.M., et al., *Species- and age-dependent changes in the relative amounts of cardiac myosin isoenzymes in mammals*. *Dev Biol*, 1981. **84**(2): p. 286-90.
41. Alpert, N.R., et al., *Molecular mechanics of mouse cardiac myosin isoforms*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2002. **283**(4): p. H1446-H1454.
42. Gu, J.-W., et al., *Long-term High Salt Diet Causes Hypertension and Decreases Renal Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Sprague-Dawley Rats*. *Journal of the American Society of Hypertension : JASH*, 2008. **2**(4): p. 275-285.
43. Crowley, S.D., et al., *Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. **103**(47): p. 17985-17990.
44. Rockman, H.A., et al., *Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991. **88**(18): p. 8277-8281.
45. deAlmeida, A.C., R.J. van Oort, and X.H. Wehrens, *Transverse aortic constriction in mice*. *J Vis Exp*, 2010(38).
46. Kuster, G.M., et al., *Mineralocorticoid receptor inhibition ameliorates the transition to myocardial failure and decreases oxidative stress and inflammation in mice with chronic pressure overload*. *Circulation*, 2005. **111**(4): p. 420-7.
47. Grimm, D., et al., *Regulation of extracellular matrix proteins in pressure-overload cardiac hypertrophy: effects of angiotensin converting enzyme inhibition*. *J Hypertens*, 1998. **16**(9): p. 1345-55.
48. Ying, X., et al., *Characterization of the Inflammatory and Fibrotic Response in a Mouse Model of Cardiac Pressure Overload*. *Histochemistry and cell biology*, 2009. **131**(4): p. 471-481.
49. Nishida, M., et al., *P2Y(6) receptor-Gα(12/13) signalling in cardiomyocytes triggers pressure overload-induced cardiac fibrosis*. *The EMBO Journal*, 2008. **27**(23): p. 3104-3115.
50. Frangogiannis, N.G., *The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2017. **127**(5): p. 1600-1612.
51. Konstandin, M.H., et al., *Fibronectin contributes to pathological cardiac hypertrophy but not physiological growth*. *Basic Res Cardiol*, 2013. **108**(5): p. 375.
52. Hulsmans, M., F. Sam, and M. Nahrendorf, *Monocyte and Macrophage Contributions to Cardiac Remodeling*. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2016. **93**: p. 149-155.

53. Wells, J.M., A. Gaggari, and J.E. Blalock, *MMP generated Matrikines*. Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology, 2015. **44-46**: p. 122-129.
54. Bonafè, F., et al., *Hyaluronan and cardiac regeneration*. Journal of Biomedical Science, 2014. **21**: p. 100.
55. Moustakas, A. and P. Heldin, *TGF β and matrix-regulated epithelial to mesenchymal transition*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2014. **1840**(8): p. 2621-2634.
56. Weigel, P.H., V.C. Hascall, and M. Tammi, *Hyaluronan synthases*. J Biol Chem, 1997. **272**(22): p. 13997-4000.
57. Itano, N. and K. Kimata, *Mammalian hyaluronan synthases*. IUBMB Life, 2002. **54**(4): p. 195-9.
58. Spicer, A.P. and J.A. McDonald, *Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family*. J Biol Chem, 1998. **273**(4): p. 1923-32.
59. Hargittai, I. and M. Hargittai, *Molecular structure of hyaluronan: an introduction*. Structural Chemistry, 2008. **19**(5): p. 697-717.
60. Hellman, U., et al., *Temporal correlation between transcriptional changes and increased synthesis of hyaluronan in experimental cardiac hypertrophy*. Genomics, 2010. **96**(2): p. 73-81.
61. Fraser, J.R.E., T.C. Laurent, and U.B.G. Laurent, *Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover*. Journal of Internal Medicine, 2003. **242**(1): p. 27-33.
62. Vigetti, D., et al., *Hyaluronan: Biosynthesis and signaling*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2014. **1840**(8): p. 2452-2459.
63. Jiang, D., J. Liang, and P.W. Noble, *Hyaluronan as an immune regulator in human diseases*. Physiol Rev, 2011. **91**(1): p. 221-64.
64. West, D.C., et al., *Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid*. Science, 1985. **228**(4705): p. 1324-6.
65. Schmaus, A., et al., *Accumulation of small hyaluronan oligosaccharides in tumour interstitial fluid correlates with lymphatic invasion and lymph node metastasis*. Br J Cancer, 2014. **111**(3): p. 559-67.
66. Termeer, C., et al., *Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4*. J Exp Med, 2002. **195**(1): p. 99-111.
67. Scheibner, K.A., et al., *Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2*. J Immunol, 2006. **177**(2): p. 1272-81.
68. Hodge-Dufour, J., et al., *Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages*. J Immunol, 1997. **159**(5): p. 2492-500.
69. Black, K.E., et al., *Hyaluronan fragments induce IFN β via a novel TLR4-TRIF-TBK1-IRF3-dependent pathway*. J Inflamm (Lond), 2013. **10**(1): p. 23.
70. Aruffo, A., et al., *CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate*. Cell, 1990. **61**(7): p. 1303-13.
71. Camenisch, T.D., et al., *Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme*. J Clin Invest, 2000. **106**(3): p. 349-60.
72. Homann, S., et al., *Hyaluronan synthase 3 promotes plaque inflammation and atheroprogession*. Matrix Biol, 2018. **66**: p. 67-80.
73. Muller, J., et al., *Interleukin-6-dependent phenotypic modulation of cardiac fibroblasts after acute myocardial infarction*. Basic Res Cardiol, 2014. **109**(6): p. 440.
74. Hellman, U., *Hyaluronan, a beneficial glycosaminoglycan that may affect the phenotype of cardiac hypertrophy – a hypothesis*. Vol. 1. 2015. 226.

75. Tammi, R.H., et al., *Transcriptional and post-translational regulation of hyaluronan synthesis*. *Febs j*, 2011. **278**(9): p. 1419-28.
76. Csoka, A.B., G.I. Frost, and R. Stern, *The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes*. *Matrix Biology*, 2001. **20**(8): p. 499-508.
77. Stern, R. and M.J. Jedrzejewski, *Hyaluronidases: Their genomics, structures, and mechanisms of action*. *Chemical Reviews*, 2006. **106**(3): p. 818-839.
78. Stern, R., *Hyaluronan catabolism: A new metabolic pathway*. *European Journal of Cell Biology*, 2004. **83**(7): p. 317-325.
79. Šoltés, L., et al., *Degradative action of reactive oxygen species on hyaluronan*. *Biomacromolecules*, 2006. **7**(3): p. 659-668.
80. Gao, F., et al., *Extracellular superoxide dismutase inhibits inflammation by preventing oxidative fragmentation of hyaluronan*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. **283**(10): p. 6058-6066.
81. Takeda, S. and M. Aburada, *The choleric mechanism of coumarin compounds and phenolic compounds*. *J Pharmacobiodyn*, 1981. **4**(9): p. 724-34.
82. Dolorgiet, *Fachinformation Cholspamin(R) forte*. 2003.
83. Gonzalo-Garijo, M.A., F. Revenga-Arranz, and I. Moneo-Goiri, *Anaphylactic-type reaction to hymecromone*. *Allergy*, 1996. **51**(6): p. 442-3.
84. Sticher, O., *Phenolische Verbindungen*. *Pharmakognosie - Phytopharmazie*, ed. R. Hänsel and O. Sticher. Vol. 9. 2010, Heidelberg: Springer Medizin Verlag. 1051-206.
85. Nakamura, T., et al., *Hyaluronic-Acid-Deficient Extracellular Matrix Induced by Addition of 4-Methylumbelliferone to the Medium of Cultured Human Skin Fibroblasts*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1995. **208**(2): p. 470-475.
86. Kakizaki, I., et al., *A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(32): p. 33281-9.
87. Kuipers, H.F., et al., *The pharmacokinetics and dosing of oral 4-methylumbelliferone for inhibition of hyaluronan synthesis in mice*. *Clinical and Experimental Immunology*, 2016. **185**(3): p. 372-381.
88. Lokeshwar, V.B., et al., *Antitumor Activity of Hyaluronic Acid Synthesis Inhibitor 4-Methylumbelliferone in Prostate Cancer Cells*. *Cancer Research*, 2010. **70**(7): p. 2613.
89. Kultti, A., et al., *4-Methylumbelliferone inhibits hyaluronan synthesis by depletion of cellular UDP-glucuronic acid and downregulation of hyaluronan synthase 2 and 3*. *Exp Cell Res*, 2009. **315**(11): p. 1914-23.
90. Nagy, N., et al., *4-Methylumbelliferone Treatment and Hyaluronan Inhibition as a Therapeutic Strategy in Inflammation, Autoimmunity, and Cancer*. *Frontiers in Immunology*, 2015. **6**: p. 123.
91. Vigetti, D., et al., *The effects of 4-methylumbelliferone on hyaluronan synthesis, MMP2 activity, proliferation, and motility of human aortic smooth muscle cells*. *Glycobiology*, 2009. **19**(5): p. 537-46.
92. Lokeshwar, V.B., et al., *Antitumor activity of hyaluronic acid synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone in prostate cancer cells*. *Cancer research*, 2010. **70**(7): p. 2613-23.
93. Kuroda, Y., et al., *4-Methylumbelliferone inhibits the phosphorylation of hyaluronan synthase 2 induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate*. *Biomed Res*, 2013. **34**(2): p. 97-103.
94. Rilla, K., et al., *Plasma membrane residence of hyaluronan synthase is coupled to its enzymatic activity*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(36): p. 31890-7.

95. ImageJ. *Colour Deconvolution*. 28.08.2018; Available from: http://imagej.net/Colour_Deconvolution; vom 27.11.2016.
96. Ho, M.K. and T.A. Springer, *Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies*. *The Journal of Immunology*, 1982. **128**(3): p. 1221.
97. Primer3Plus. *Pick primers from a DNA sequence*. 28.08.2018; Available from: <http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>.
98. NCBI. *A tool for finding specific primers*. 28.08.2018; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.
99. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
100. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
101. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists*. *Nucleic Acids Res*, 2009. **37**(1): p. 1-13.
102. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. *Nat Protoc*, 2009. **4**(1): p. 44-57.
103. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. *Nat Protoc*, 2008. **3**(6): p. 1101-8.
104. Tusher, V.G., R. Tibshirani, and G. Chu, *Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(9): p. 5116-21.
105. Benjamini, Y. and Y. Hochberg, *Controlling The False Discovery Rate - A Practical And Powerful Approach To Multiple Testing*. Vol. 57. 1995. 289-300.
106. Oliveros, J.C. *Venny-An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams*. 2007-2015; Available from: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
107. Garcia-Menendez, L., et al., *Substrain specific response to cardiac pressure overload in C57BL/6 mice*. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 2013. **305**(3): p. H397-H402.
108. Nagy, N., et al., *Inhibition of hyaluronan synthesis accelerates murine atherosclerosis: novel insights into the role of hyaluronan synthesis*. *Circulation*, 2010. **122**(22): p. 2313-22.
109. Rilla, K., et al., *The hyaluronan synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone prevents keratinocyte activation and epidermal hyperproliferation induced by epidermal growth factor*. *J Invest Dermatol*, 2004. **123**(4): p. 708-14.
110. Mahaffey, C.L. and M.E. Mummert, *Hyaluronan synthesis is required for IL-2-mediated T cell proliferation*. *J Immunol*, 2007. **179**(12): p. 8191-9.
111. Garcia-Vilas, J.A., A.R. Quesada, and M.A. Medina, *4-methylumbelliferone inhibits angiogenesis in vitro and in vivo*. *J Agric Food Chem*, 2013. **61**(17): p. 4063-71.
112. Yoshihara, S., et al., *A hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, inhibits liver metastasis of melanoma cells*. *FEBS letters*, 2005. **579**(12): p. 2722-6.
113. Bollyky, P.L., et al., *Th1 cytokines promote T-cell binding to antigen-presenting cells via enhanced hyaluronan production and accumulation at the immune synapse*. *Cell Mol Immunol*, 2010. **7**(3): p. 211-20.
114. Lorenz, K., et al., *Cardiac hypertrophy: targeting Raf/MEK/ERK1/2-signaling*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009. **41**(12): p. 2351-5.

115. Hang, C.T., et al., *Chromatin regulation by Brg1 underlies heart muscle development and disease*. Nature, 2010. **466**(7302): p. 62-7.
116. Ho, C.Y., et al., *Myocardial Fibrosis as an Early Manifestation of Hypertrophic Cardiomyopathy*. New England Journal of Medicine, 2010. **363**(6): p. 552-563.
117. Zhao, C.H., et al., *RIP2 deficiency attenuates cardiac hypertrophy, inflammation and fibrosis in pressure overload induced mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2017. **493**(2): p. 1151-1158.
118. Ghazalpour, A., et al., *Comparative Analysis of Proteome and Transcriptome Variation in Mouse*. PLoS Genetics, 2011. **7**(6): p. e1001393.
119. Foss, E.J., et al., *Genetic basis of proteome variation in yeast*. Nat Genet, 2007. **39**(11): p. 1369-75.
120. Chen, G., et al., *Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas*. Mol Cell Proteomics, 2002. **1**(4): p. 304-13.
121. Pascal, L.E., et al., *Correlation of mRNA and protein levels: cell type-specific gene expression of cluster designation antigens in the prostate*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 246.
122. Gygi, S.P., et al., *Correlation between protein and mRNA abundance in yeast*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(3): p. 1720-30.
123. Yeung, E.S., *Genome-wide correlation between mRNA and protein in a single cell*. Angew Chem Int Ed Engl, 2011. **50**(3): p. 583-5.
124. *Autoregulation of tubulin synthesis in hepatocytes and fibroblasts*. The Journal of Cell Biology, 1985. **101**(5): p. 1763-1772.
125. Schwanhäusser, B., et al., *Global quantification of mammalian gene expression control*. Nature, 2011. **473**: p. 337.
126. Vogel, C. and E.M. Marcotte, *Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses*. Nature reviews. Genetics, 2012. **13**(4): p. 227-232.
127. Waldenstrom, A., et al., *Accumulation of hyaluronan and tissue edema in experimental myocardial infarction*. J Clin Invest, 1991. **88**(5): p. 1622-8.
128. Petz, A., et al., *Hyaluronan-synthase 2 deficiency results in poor cardiac healing and reduced macrophage abundance in the heart after ischemia/reperfusion*. Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology, 2018. **391**: p. S36-S36.
129. Hellman, U., et al., *Parallel up-regulation of FGF-2 and hyaluronan during development of cardiac hypertrophy in rat*. Cell and Tissue Research, 2008. **332**(1): p. 49-56.
130. Bai, K.J., et al., *The role of hyaluronan synthase 3 in ventilator-induced lung injury*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(1): p. 92-8.
131. Kobayashi, N., et al., *Hyaluronan deficiency in tumor stroma impairs macrophage trafficking and tumor neovascularization*. Cancer Res, 2010. **70**(18): p. 7073-83.
132. Törrönen, K., et al., *Tissue distribution and subcellular localization of hyaluronan synthase isoenzymes*. Histochemistry and Cell Biology, 2014. **141**(1): p. 17-31.
133. Tien, J.Y. and A.P. Spicer, *Three vertebrate hyaluronan synthases are expressed during mouse development in distinct spatial and temporal patterns*. Dev Dyn, 2005. **233**(1): p. 130-41.
134. Hellman, U., et al., *Growth factor PDGF-BB stimulates cultured cardiomyocytes to synthesize the extracellular matrix component hyaluronan*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e14393.
135. Hascall, V.C., et al., *Intracellular hyaluronan: a new frontier for inflammation?* Biochim Biophys Acta, 2004. **1673**(1-2): p. 3-12.

136. Wang, Y., et al., *Sugemule-3 Protects against Isoprenaline-induced Cardiotoxicity In vitro*. Pharmacognosy Magazine, 2017. **13**(51): p. 517-522.
137. Garrett, E.R., et al., *Pharmacokinetics and bioavailabilities of hymecromone in human volunteers*. Biopharm Drug Dispos, 1993. **14**(1): p. 13-39.
138. Kuipers, H.F., et al., *Hyaluronan synthesis is necessary for autoreactive T-cell trafficking, activation, and Th1 polarization*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016. **113**(5): p. 1339-1344.
139. Nagy, N., et al., *Inhibition of hyaluronan synthesis restores immune tolerance during autoimmune insulinitis*. The Journal of Clinical Investigation, 2015. **125**(10): p. 3928-3940.
140. Calabro, A., et al., *Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) of glycosaminoglycans*. Osteoarthritis Cartilage, 2001. **9 Suppl A**: p. S16-22.
141. Gassler, N., et al., *A high performance liquid chromatography method for the determination of glycosaminoglycans in human blood*. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1993. **31**(8): p. 503-11.
142. Hellström, M., et al., *Hyaluronan and Collagen in Human Hypertrophic Cardiomyopathy: A Morphological Analysis*. Cardiology Research and Practice, 2012. **2012**: p. 545219.
143. Day, A.J. and C.A. de la Motte, *Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation?* Trends Immunol, 2005. **26**(12): p. 637-43.
144. Esposito, G., et al., *Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress*. Circulation, 2002. **105**(1): p. 85-92.
145. Hill, J.A., et al., *Cardiac hypertrophy is not a required compensatory response to short-term pressure overload*. Circulation, 2000. **101**(24): p. 2863-9.
146. Berk, B.C., K. Fujiwara, and S. Lehoux, *ECM remodeling in hypertensive heart disease*. J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 568-75.
147. Brilla, C.G., R.C. Funck, and H. Rupp, *Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis in patients with hypertensive heart disease*. Circulation, 2000. **102**(12): p. 1388-93.
148. Brilla, C.G., L. Matsubara, and K.T. Weber, *Advanced hypertensive heart disease in spontaneously hypertensive rats. Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis*. Hypertension, 1996. **28**(2): p. 269-75.
149. Talman, V. and H. Ruskoaho, *Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration*. Cell and Tissue Research, 2016. **365**(3): p. 563-581.
150. Sane, D.C., W.S. Mozingo, and R.C. Becker, *Cardiac rupture after myocardial infarction: new insights from murine models*. Cardiol Rev, 2009. **17**(6): p. 293-9.
151. Janicki, J.S. and G.L. Brower, *The role of myocardial fibrillar collagen in ventricular remodeling and function*. J Card Fail, 2002. **8**(6 Suppl): p. S319-25.
152. Xia, Y., et al., *Characterization of the inflammatory and fibrotic response in a mouse model of cardiac pressure overload*. Histochemistry and Cell Biology, 2009. **131**(4): p. 471-481.
153. Kuusisto, J., et al., *Low-grade inflammation and the phenotypic expression of myocardial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy*. Heart, 2012. **98**(13): p. 1007-13.
154. Erten, Y., et al., *An association between inflammatory state and left ventricular hypertrophy in hemodialysis patients*. Ren Fail, 2005. **27**(5): p. 581-9.
155. Hirota, H., et al., *Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 4862-6.

156. Heymans, S., et al., *Macrophage microRNA-155 promotes cardiac hypertrophy and failure*. *Circulation*, 2013. **128**(13): p. 1420-32.
157. Frantz, S. and M. Nahrendorf, *Cardiac macrophages and their role in ischaemic heart disease*. *Cardiovasc Res*, 2014. **102**(2): p. 240-8.
158. Nahrendorf, M., M.J. Pittet, and F.K. Swirski, *Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction*. *Circulation*, 2010. **121**(22): p. 2437-45.
159. 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.
160. Walter, W., et al., *Deciphering the Dynamic Transcriptional and Post-transcriptional Networks of Macrophages in the Healthy Heart and after Myocardial Injury*. *Cell Rep*, 2018. **23**(2): p. 622-636.
161. Troidl, C., et al., *Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction*. *J Cell Mol Med*, 2009. **13**(9b): p. 3485-96.
162. Hilgendorf, I., et al., *Ly-6Chigh monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium*. *Circ Res*, 2014. **114**(10): p. 1611-22.
163. Ma, Y., A.J. Mouton, and M.L. Lindsey, *Cardiac macrophage biology in the steady-state heart, the aging heart, and following myocardial infarction*. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, 2018. **191**: p. 15-28.
164. Weisheit, C., et al., *Ly6C(low) and Not Ly6C(high) Macrophages Accumulate First in the Heart in a Model of Murine Pressure-Overload*. *PLoS ONE*, 2014. **9**(11): p. e112710.
165. Potteaux, S., et al., *Suppressed monocyte recruitment drives macrophage removal from atherosclerotic plaques of Apoe(-/-) mice during disease regression*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2011. **121**(5): p. 2025-2036.
166. Tokuda, K., et al., *Pressure-independent effects of angiotensin II on hypertensive myocardial fibrosis*. *Hypertension*, 2004. **43**(2): p. 499-503.
167. Sun, M., et al., *Tumor necrosis factor-alpha mediates cardiac remodeling and ventricular dysfunction after pressure overload state*. *Circulation*, 2007. **115**(11): p. 1398-407.
168. Ho, J.E., et al., *Galectin-3, a marker of cardiac fibrosis, predicts incident heart failure in the community*. *J Am Coll Cardiol*, 2012. **60**(14): p. 1249-56.
169. Suthahar, N., et al., *Galectin-3 Activation and Inhibition in Heart Failure and Cardiovascular Disease: An Update*. *Theranostics*, 2018. **8**(3): p. 593-609.
170. Sharma, U.C., et al., *Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction*. *Circulation*, 2004. **110**(19): p. 3121-8.
171. Laroumanie, F., et al., *CD4+ T cells promote the transition from hypertrophy to heart failure during chronic pressure overload*. *Circulation*, 2014. **129**(21): p. 2111-24.
172. Baaten, B.J.G., et al., *Regulation of Antigen-Experienced T Cells: Lessons from the Quintessential Memory Marker CD44*. *Frontiers in Immunology*, 2012. **3**: p. 23.
173. Rampanelli, E., et al., *CD44-Deficiency Attenuates the Immunologic Responses to LPS and Delays the Onset of Endotoxic Shock-Induced Renal Inflammation and Dysfunction*. *PLOS ONE*, 2013. **8**(12): p. e84479.
174. de la Motte, C., et al., *Platelet-derived hyaluronidase 2 cleaves hyaluronan into fragments that trigger monocyte-mediated production of proinflammatory cytokines*. *Am J Pathol*, 2009. **174**(6): p. 2254-64.

175. Yamawaki, H., et al., *Hyaluronan receptors involved in cytokine induction in monocytes*. *Glycobiology*, 2009. **19**(1): p. 83-92.
176. Schultz, J.E., et al., *Fibroblast growth factor-2 mediates pressure-induced hypertrophic response*. *J Clin Invest*, 1999. **104**(6): p. 709-19.
177. Bogoyevitch, M.A., et al., *Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes. The potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(2): p. 1110-9.
178. Maillet, M., J.H. van Berlo, and J.D. Molkentin, *Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013. **14**(1): p. 38-48.
179. Yamamoto, K., et al., *Myocardial stiffness is determined by ventricular fibrosis, but not by compensatory or excessive hypertrophy in hypertensive heart*. *Cardiovasc Res*, 2002. **55**(1): p. 76-82.
180. Fujiwaki, R., et al., *Thymidylate synthase expression in epithelial ovarian cancer: relationship with thymidine phosphorylase expression and prognosis*. *Oncology*, 2000. **59**(2): p. 152-7.
181. Piccioni, F., et al., *Antitumor effects of hyaluronic acid inhibitor 4-methylumbelliferone in an orthotopic hepatocellular carcinoma model in mice*. *Glycobiology*, 2012. **22**(3): p. 400-10.

Appendix

Tabelle 12: Futterzusammensetzung. Das Futter der 4-Methylumbelliferon (4-MU)-behandelten Mäuse und der Kontrollmäuse wurde zusätzlich mit Schokoladenaroma und weiteren ernährungsphysiologischen Zusatzstoffen supplementiert. 4-MU wurde in einer Konzentration von 50 g pro kg Futter zugesetzt.

Inhaltsstoffe	relativer Anteil [%]
Rohprotein	19,0
Rohfett	3,3
Rohfaser	4,9
Rohasche	6,4
Stärke	36,5
Zucker	4,7

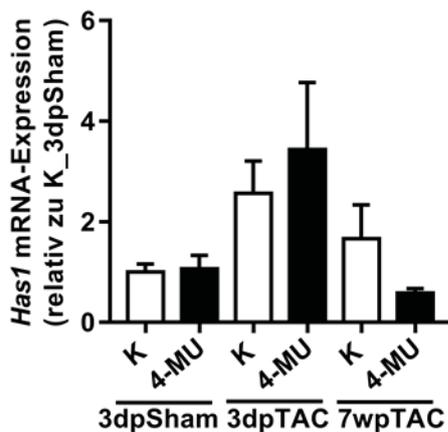


Abbildung 45: Kardiale mRNA-Expression von *Has1* 3 Tage sowie 7 Wochen nach operativer Aortenstenose (3dpTAC, 7wpTAC) bzw. nach Schein-Operation (3dpSham). Messung der Expressionsstärke erfolgte in Mäusen nach 4-Methylumbelliferon-Behandlung (4-MU) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (K) mittels qPCR. Als Referenzgen wurde *Gapdh* verwendet. Dargestellt als Vielfaches der Kontrolle (hier: K_3dpSham); Mittelwert \pm SEM; n = 5 - 13; *one-way* ANOVA.

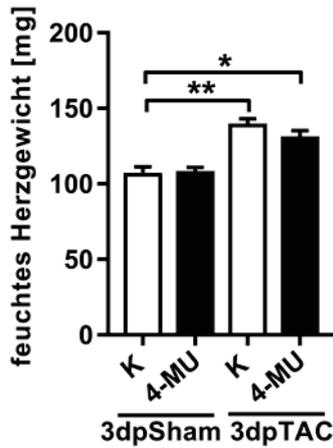


Abbildung 46: Feuchtherzgewicht 3 Tage nach operativer Aortenstenose bzw. nach Schein-Operation (3dpSham). Verglichen wurde das Herzgewicht von 4-Methylumbelliferon-behandelten Mäusen (4-MU) und unbehandelten Kontrollmäusen (K) bei Versuchsende. Das durchschnittliche Feuchtherzgewicht der Kontrolle (K_3dpSham) beträgt 106,1 mg. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; $n = 5 - 11$; *one-way ANOVA*; * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ gegen Kontrolle.

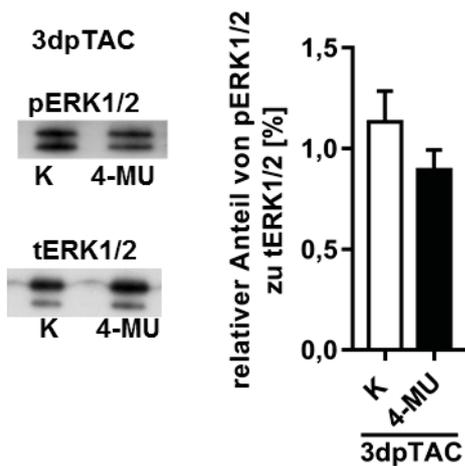


Abbildung 47: Phosphorylierung von ERK1/2 im Herzen 7 Wochen nach operativer Aortenstenose (7wpTAC). Vergleich von 4-Methylumbelliferon-behandelten Mäusen (4-MU) und unbehandelten Kontrollmäusen (K). Repräsentativer *Western Blot* von phosphorylierten (pERK1/2) und totalen ERK1/2 (tERK1/2) sowie Quantifizierung der relativen Anteile. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM; $n = 11$; *t-Test*.

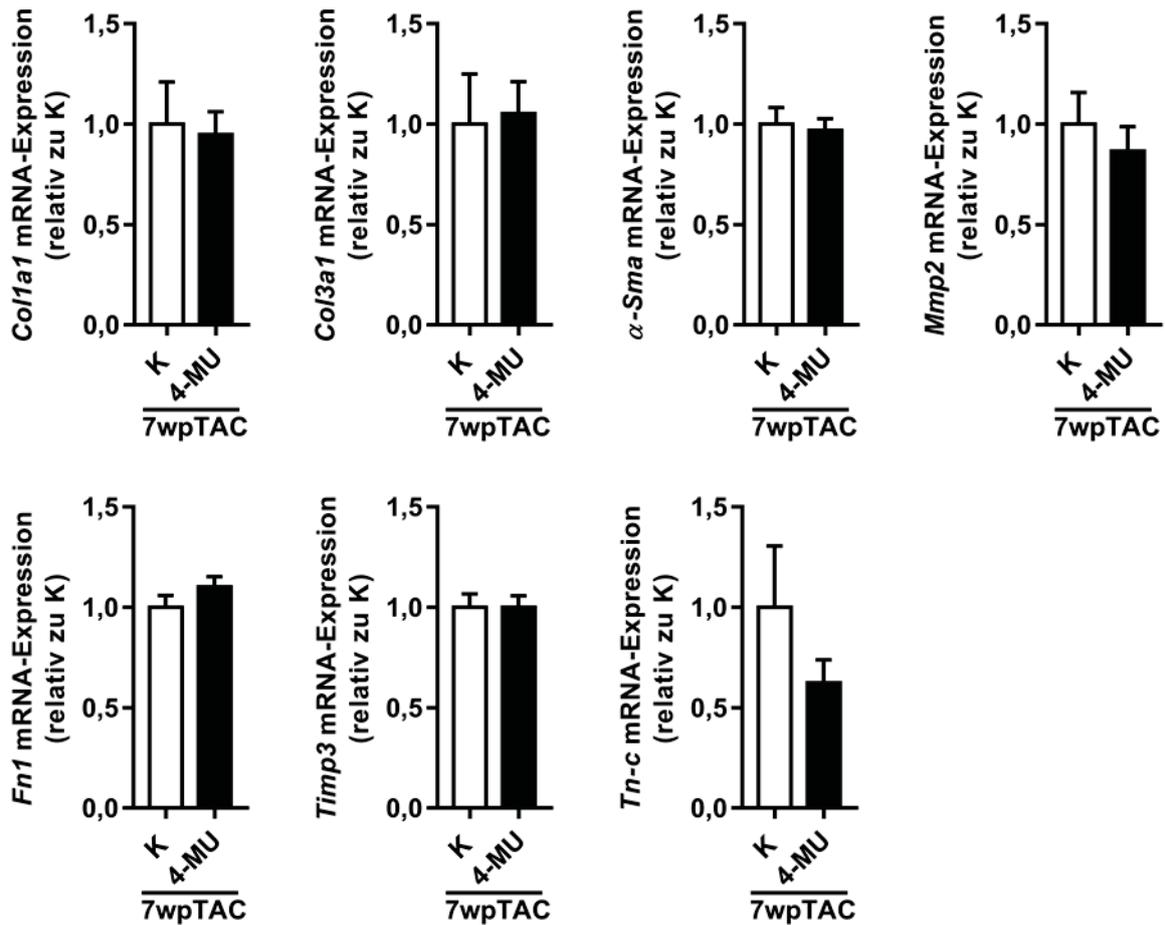


Abbildung 48: Kardiale mRNA-Expression von Fibrose-assoziierten Genen 7 Wochen nach operativer Aortenstenose (7wpTAC). Messung der Expressionsstärke von *Col1a1*, *Col3a1*, α -*Sma*, *Mmp2*, *Fn1*, *Timp3* sowie *Tn-c* erfolgte in Mäusen nach 4-Methylumbelliferon-Behandlung (4-MU) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (K) mittels qPCR. Als Referenzen wurde *Gapdh* verwendet. Dargestellt als Vielfaches der Kontrolle; Mittelwert \pm SEM; n = 13; t-Test.

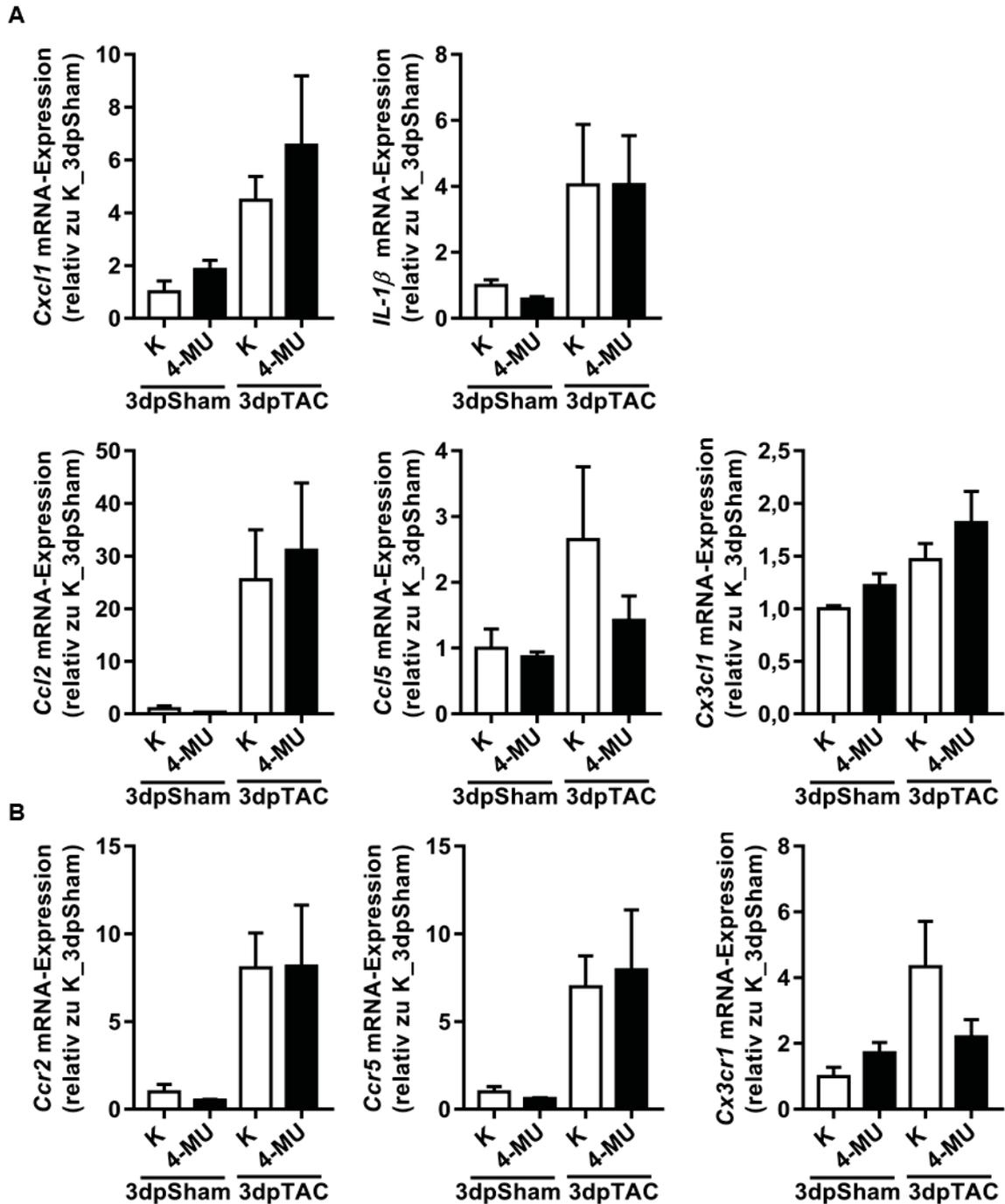


Abbildung 49: Kardiale mRNA-Expression von Entzündungsmarkern 3 Tage nach operativer Aortenstenose (3dpTAC) bzw. nach Schein-Operation (3dpSham). Messung der Expressionsstärke der Liganden *Ccl2*, *Ccl5*, *Cx3cl1*, *Cxcl1* und *IL-1 β* (**A**) sowie der Rezeptoren *Ccr2*, *Ccr5* und *Cxcr1* (**B**) erfolgte in Mäusen nach 4-Methylumbelliferon-Behandlung (4-MU) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (K) mittels qPCR. Als Referenzen wurde *Gapdh* verwendet. Dargestellt als Vielfaches der Kontrolle (hier: K_3dpSham); Mittelwert \pm SEM; n = 5 - 11; one-way ANOVA.

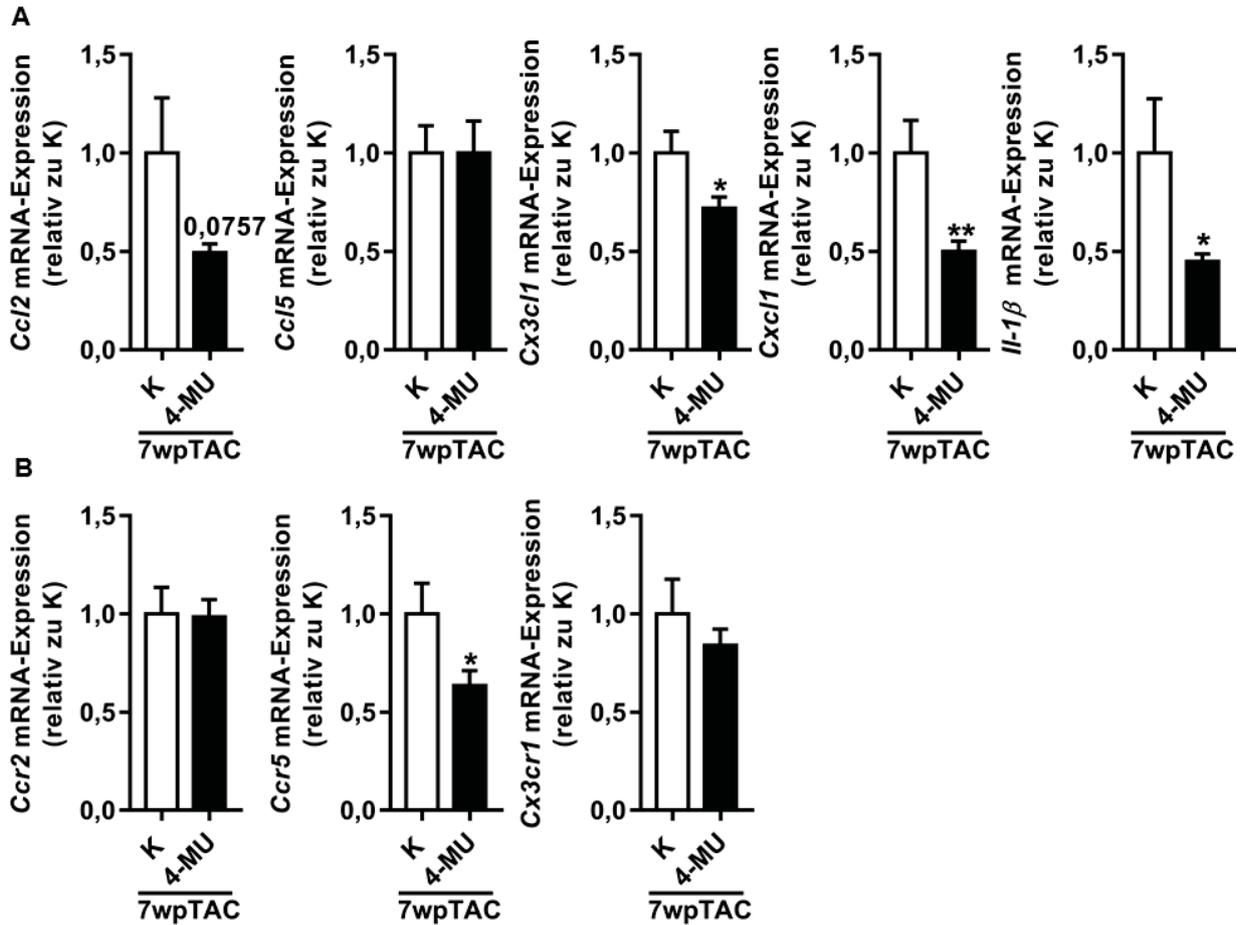


Abbildung 50: Kardiale mRNA-Expression von Entzündungsmarkern 7 Wochen nach operativer Aortenstenose (7wpTAC). Messung der Expressionsstärke der Liganden *Ccl2*, *Ccl5*, *Cx3c1*, *Cxcl1* und *IL-1β* (A) sowie der Rezeptoren *Ccr2*, *Ccr5* und *Cxcr1* (B) erfolgte in Mäusen nach 4-Methylumbelliferon-Behandlung (4-MU) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (K) mittels qPCR. Als Referenzgen wurde *Gapdh* verwendet. Dargestellt als Vielfaches der Kontrolle; Mittelwert \pm SEM; n = 13; t-Test; *p < 0,05.

Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Kronenbitter, A., Funk, F., **Hackert, K.**, Gorressen, S., Glaser, D., Boknik, P., Poschmann, G., Stühler, K., Isic, M., Krüger, M., Schmitt, J. P., Impaired Ca^{2+} cycling of nonischemic myocytes contributes to sarcomere dysfunction early after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 2018. 119: p. 28-39.

Blankenburg, R., **Hackert, K.**, Wurster, S., Deenen, R., Seidman, J. G., Seidman, C. E., Lohse, M. J., Schmitt, J. P., beta-Myosin heavy chain variant Val606Met causes very mild hypertrophic cardiomyopathy in mice, but exacerbates HCM phenotypes in mice carrying other HCM mutations. *Circ Res*, 2014. 115(2): p. 227-37.

Kongressbeiträge

Kronenbitter, A., Funk, F., **Hackert, K.**, Krüger, M., Schmitt, J. P., Myocardial infarction impairs myocyte calcium transport and sarcomere function in the ischemic and in the non-ischemic myocardium. 1st PhD Student Symposium of the IRTG 1902 & SFB 1116 "Cardiovascular Disease Symposium" (2018).

Kronenbitter, A., Funk, F., **Hackert, K.**, Krüger, M., Schmitt, J. P., Myocyte Ca^{2+} cycling is impaired in the nonischemic remote parts of the heart early after myocardial infarction. 46th European Muscle Conference (2017).

Kronenbitter, A., Funk, F., **Hackert, K.**, Schmitt, J. P., PKA-dependent activation of Ca^{2+} cycling proteins is impaired in the remote myocardium early after myocardial infarction. 83rd Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT) (2017).

Kronenbitter, A., **Hackert, K.**, Funk, F., Krüger, M., Schmitt, J. P., Molecular and systemic determinants of impaired sarcomere function after acute myocardial infarction. 1st International Symposium „Master switches after myocardial infarction„ (2016).

Hackert, K., Schmitt, J. P., Cell-type specific signals that mediate myocardial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy. 81st Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT) (2015).

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum, -ort	16. Juli 1987, Chojnice
Staatsangehörigkeit	Deutschland
Familienstand	ledig, 1 Kind

Akademische und schulische Laufbahn

10/2013 – 10/2018	naturwissenschaftliche Doktorandin Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf Doktorvater: Prof. Dr. med. Joachim Schmitt Thema: „Myokardiales <i>Remodeling</i> bei der Entwicklung pathologischer Hypertrophie: Die Rolle der Hyaluron- säure“
10/2010 – 08/2013	Master of Science in Biomedizin Medizinische Hochschule Hannover, Hannover
10/2007 – 09/2010	Bachelor of Science in Applied Biology (engl.) Hochschule Bonn-Rhein-Sieg, Rheinbach
08/1998 – 06/2007	Abitur, LK: Mathematik, Biologie Gymnasium Hochdahl, Erkrath

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Joachim P. Schmitt, der mir die Möglichkeit gegeben hat innerhalb seiner Arbeitsgruppe mein Promotionsvorhaben in die Tat umzusetzen. Ich habe die fachlichen Diskussionen, die intensive Betreuung und die stets positive Arbeitsatmosphäre sehr geschätzt. Außerdem bin ich für die praktische Unterstützung bei der Durchführung der operativen Aortenstenose und den echokardiografischen Untersuchungen sowie Auswertungen dankbar. Nicht zuletzt möchte ich mich auch für das entgegengebrachte Vertrauen und Verständnis bedanken, das mir ermöglicht hat sowohl meinen beruflichen als auch familiären Verpflichtungen als Mutter nachzukommen.

Ich danke außerdem Herrn Prof. Dr. Holger Stark für die Übernahme der Mentorenschaft und das in diesem Zusammenhang gezeigte Interesse für eine erfolgreichen Absolvierung meiner Promotion sowie für die anregenden Diskussionen im Rahmen der Betreuungsgespräche.

Unserem Institutsleiter, Herrn Prof. Dr. Jens W. Fischer, danke ich für die Möglichkeit am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie promovieren zu dürfen und die Unterstützung meines Promotionsvorhabens sowie für die wertvollen Diskussionen im Rahmen der Labmeetings. Außerdem gebührt Frau Prof. Dr. Maria Grandoch und Dr. Susanne Homann besonderer Dank für die Durchführung der durchflusszytometrischen Untersuchungen und Analysen. Deren Expertise im Bereich der Immunbiologie haben zum Gelingen dieser Arbeit entscheidend beigetragen. Vielen Dank auch an unsere Kooperationspartner Herr Prof. Dr. Kai Stühler, Herr Dr. Gereon Poschmann, Herr Prof. Dr. Karl Köhrer und Herr Dr. Rene Deenen vom Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum für die Umsetzung der Proteom- und Transkriptom-Analysen.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei unseren technischen Assistentinnen Frau Susanne Hölzer für die Durchführung der Genotypisierungen und bei Frau Irmhild Rüter für die Messung des Hyaluronsäure-Gehalts und die Bestimmung des Trockenherzgewichts. Ich danke außerdem dem gesamten Kollegium für die freundliche Zusammenarbeit, die stets von großer Hilfsbereitschaft geprägt war. Vor allem möchte ich mich bei Frau Dr. Annette Kronenbitter und Herrn Dr. Florian Funk für die erheiternde Arbeitsatmosphäre bedanken. Sie waren zudem während aller Höhen und Tiefen des Laboralltags eine große Unterstützung.

Mein herzlicher Dank gilt schließlich auch meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Jan und Wieslawa Hackert für die wertvolle Unterstützung während meiner Studien- und Promotionszeit, die ohne sie nicht umsetzbar gewesen wäre, und meinem Sohn Levi, der stets meine größte Motivation zur Vollendung dieses Promotionsvorhabens war.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Düsseldorf, den 19.10.2018

Katarzyna Hackert