

Aus der Klinischen Chemie und Laboratoriumsdiagnostik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Fritz Boege

Regulation der kardialen Myofibroblastendifferenzierung
– Rolle von Thioredoxin-1

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Mark Maximilian Zurek
2020

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Mark Maximilian Zurek

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. Judith Haendeler

Zweitgutachter: Prof. Dr. Axel Gödecke

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Zurek M*, Altschmied J*, Kohlgrüber S, Ale-Agha N, Haendeler J (2016) Role of Telomerase in the cardiovascular system. *Genes* 7, 29-40.

Cardiac fibroblasts are considered as critical regulators of the structure of the heart and are activated during disease-triggered scar formation and interstitial fibrosis in the context of myocardial infarction and heart failure respectively. These activated cardiac fibroblasts are called myofibroblasts, accounting for one of their main features, the expression of alpha Smooth Muscle Actin (α SMA), which makes them mechanically resistant and contractable. The Haendeler group demonstrated that Actin fiber polymerization requires the degradation of the Oxidoreductase Thioredoxin-1. Therefore, one aim of this thesis was to investigate whether myofibroblast differentiation depends on Thioredoxin-1. Moreover, recent findings suggest a role for functional mitochondria within this differentiation. Thus, another aim was to elucidate whether Telomerase Reverse Transcriptase (TERT), which has been shown to be required for mitochondrial respiration, is involved in cardiac myofibroblast differentiation. TERT is the catalytic subunit of the enzyme Telomerase that counteracts telomere shortening in the nucleus. TERT is also localized in the mitochondria, where it binds to mitochondrial DNA and improves respiratory chain activity. Thus, mice were generated, which exclusively have TERT in the mitochondria (mitoTERT mice).

Cardiac fibroblasts from wildtype, TERT-deficient, and mitoTERT mice were isolated, cultivated and treated with the cytokine Transforming Growth Factor beta 1 (TGF- β 1) to induce the myofibroblast phenotype. As a surrogate marker for this differentiation, α SMA protein levels were measured. Moreover, cellular morphology was analyzed by immunostaining. Cardiac fibroblasts from TERT-deficient mice were unable to differentiate into myofibroblasts. In contrast, cells from mitoTERT hearts showed improved myofibroblast differentiation when compared to wildtype fibroblasts. The defect in TERT-deficient cells was attributed to their inability to induce reactive oxygen species and to degrade Thioredoxin-1 upon TGF- β 1 treatment. These defects were fully compensated in fibroblasts from mitoTERT mice, which even showed improvements over the wildtype cells.

In summary, Thioredoxin-1 is crucially involved in myofibroblast differentiation as its degradation is necessary for efficient phenotype switching of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. Moreover, TERT-deficiency results in impaired myofibroblast differentiation capacity, which is not only rescued, but also improved by mitochondrial TERT.

Kardiale Fibroblasten gelten als kritische Regulatoren der Struktur des Herzgewebes. Sie werden während der Narbenbildung nach Myokardinfarkt in der interstitiellen Fibrose im Kontext der Herzinsuffizienz aktiviert. Diese aktivierten kardiale Fibroblasten werden aufgrund einer ihrer Hauptcharakteristika, der Expression von glattmuskulärem alpha Aktin (alpha Smooth Muscle Actin, α SMA), das sie mechanisch widerstandsfähig und kontraktionsfähig macht, als Myofibroblasten bezeichnet. Die Arbeitsgruppe Haendeler hatte gezeigt, dass zur Aktin-Faser-Polymerisation der Abbau der Oxidoreduktase Thioredoxin-1 notwendig ist. Daher war ein Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob die Myofibroblastendifferenzierung von Thioredoxin-1 abhängig ist. Zudem legen neuere Studien nahe, dass funktionelle Mitochondrien eine Rolle in dieser Differenzierung spielen. Daher war ein weiteres Ziel aufzuklären ob Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) in die kardiale Myofibroblastendifferenzierung involviert ist, da gezeigt worden war, dass sie für die mitochondriale Atmung notwendig ist. TERT ist die katalytische Untereinheit des Enzyms Telomerase, welches der Telomerverkürzung im Zellkern entgegenwirkt. TERT ist aber auch in den Mitochondrien lokalisiert, wo sie an mitochondriale DNA bindet und die Atmungskettenaktivität verbessert. Daher waren Mäuse generiert worden, die TERT exklusiv in den Mitochondrien enthalten (mitoTERT Mäuse).

Kardiale Fibroblasten wurden aus Wildtyp, TERT-defizienten und mitoTERT Mäusen isoliert, kultiviert und zur Induktion der Myofibroblastendifferenzierung mit dem Zytokin Transformierender Wachstumsfaktor beta 1 (Transforming Growth Factor β 1, TGF- β 1) behandelt. Als Surrogatmarker für diese Differenzierung wurden die α SMA Proteinlevel gemessen. Zudem wurde die Zellmorphologie mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen untersucht.

Kardiale Fibroblasten aus TERT-defizienten Mäusen waren nicht in der Lage in Myofibroblasten zu differenzieren. Im Gegensatz dazu zeigten die Zellen aus mitoTERT Herzen eine verbesserte Differenzierung im Vergleich mit Zellen aus wildtypischen Tieren. Der Defekt in den TERT-defizienten Zellen konnte darauf zurückgeführt werden, dass diese nach TGF- β 1 Behandlung nicht in der Lage waren reaktive Sauerstoffspezies zu induzieren und Thioredoxin-1 abzubauen. Diese Defekte waren in Fibroblasten aus mitoTERT Mäusen vollständig kompensiert, welche sogar Verbesserungen gegenüber den Wildtyp Zellen zeigten.

Zusammenfassend ist Thioredoxin-1 entscheidend in die Myofibroblastendifferenzierung involviert, da sein Abbau notwendig für den Phänotypwechsel kardialer Fibroblasten zu Myofibroblasten ist. Zudem resultiert TERT-Defizienz in einer verminderten Myofibroblastendifferenzierungs-Kapazität, welche durch mitochondriale TERT nicht nur wiederhergestellt sondern sogar verbessert wird.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APEX1	<i>DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase</i>
ASK1	<i>Apoptosis signal-regulating kinase-1</i>
α SMA	<i>alpha smooth muscle</i> Aktin
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dH ₂ O	Destilliertes Wasser (Reinstwasser)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
FACS	<i>Flourescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (Fötales Kälberserum)
H ₂ -DCF-DA	2',7'-Dichlordihydrofluorescein-diacetat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HO-	Hydrogenperoxid
kDA	Kilodalton
ml	Milliliter
MMP2	Matrix-Metalloproteinase 2
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NOX4	NADPH Oxidase 4
O ₂ ⁻	Superoxid
PFA	Paraformaldehyd
PVDF	Polyvinylidenfluorid

RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribinukleinsäure)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> -Polyacrylamid Gelelektrophorese
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
TERC	<i>Telomerase RNA component</i>
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i> (Telomerase Reverse Transkriptase)
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
TIFF	Tagged Image File Format
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trx-1	Thioredoxin-1
U	Unit (Einheit)
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
xg	x-fache der mittleren Erdbeschleunigung
μ l	Mikroliter

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Kardiale Fibrose	1
1.2	Myokardinfarkt und der Ischämie-Reperfusionsschaden	2
1.3	Oxidativer Stress und Redox-Homöostase	2
1.4	Thioredoxin-1	3
1.5	Der kardiale Fibroblast	4
1.6	Telomere und die Telomerase	5
1.6.1	<i>TERT non-kanonische Kernfunktionen</i>	6
1.6.2	<i>TERT non-kanonische Funktionen außerhalb des Zellkerns</i>	6
1.7	Ziele der Arbeit	7
2	MATERIAL UND METHODEN	8
2.1	Chemikalien	8
2.2	Kommerziell erworbene Puffer, Lösungen, Reagenzien und Kits	8
2.3	Labormaterialien und Geräte	9
2.4	Tiermodelle und genetischer Hintergrund	11
2.5	Tierexperimentelle Genehmigung	11
2.6	Zellbiologische Methoden	11
2.6.1	<i>Isolation von kardialen Fibroblasten</i>	11
2.6.2	<i>Kultivierung von kardialen Fibroblasten</i>	13
2.6.3	<i>Passagieren der Fibroblasten</i>	13
2.6.4	<i>Bestimmung der Zellzahl</i>	13
2.6.5	<i>TGF-β1 Behandlung der Zellen</i>	14
2.6.6	<i>Zellernte</i>	14
2.7	Proteinbiochemische Methoden	14
2.7.1	<i>Lyse von Zellen mit RIPA-Puffer</i>	14
2.7.2	<i>Proteinbestimmung nach Bradford</i>	15
2.7.3	<i>Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate) - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	15
2.7.4	<i>Western-Blot mit anschließender Immundetektion</i>	16
2.7.5	<i>Immunfluoreszenzfärbung</i>	18
2.7.6	<i>Durchflusszytometrische Messung reaktiver Sauerstoffspezies</i>	20
2.8	Molekularbiologische Methoden	21
2.8.1	<i>RNA-Isolation</i>	21
2.8.2	<i>Photometrische Quantifizierung der RNA-Konzentration</i>	22
2.8.3	<i>DNase Verdau der RNA</i>	22
2.8.4	<i>Reverse Transkription</i>	22
2.8.5	<i>Semiquantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (semiquantitative real-time polymerase chain reaction)</i>	23
2.8.6	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	24
2.8.7	<i>Medien und Puffer</i>	24
2.9	Statistische Auswertung	26
3	ERGEBNISSE	26
3.1	Etablierung der Isolation und Kultivierung primärer muriner Fibroblasten des Herzens	26
3.2	Serumentzug der Zellen	27
3.3	Induktion des Myofibroblasten-Phänotyps	28
3.4	Der Einfluss von TERT auf die Myofibroblasten-Differenzierung	29
3.4.1	<i>Immunfluoreszenzfärbung</i>	30
3.4.2	<i>Proteinbiochemische Auswertung</i>	32
3.5	Rolle von TERT bei der TGF- β 1-induzierten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	33
3.6	Einfluss von TERT auf die Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP2) RNA Menge	34
3.7	Einfluss von TERT auf die NOTCH-1 RNA Menge	34
3.8	Einfluss von TERT auf die Thioredoxin-1 RNA Menge	35
3.9	Einfluss von TERT auf die Thioredoxin-1 Proteinmenge	36
4	DISKUSSION	38

4.1	Ausblick	42
4.2	Schlussfolgerung	43
5	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	44
6	DANKSAGUNGEN	

1 Einleitung

Weltweit sind Erkrankungen des kardiovaskulären Systems (CVD) nach wie vor die häufigste Todesursache. Im Jahr 2015 starben 17,9 Millionen Menschen an CVD; dies entsprach 31,2 % aller Tode weltweit [1]. In Europa sterben jährlich vier Millionen Menschen an den Folgen kardiovaskulärer Erkrankungen; dies entspricht 45% aller Todesfälle jährlich [2].

In Reaktion auf pathologische Stimuli wie beispielsweise einen Ischämie-Reperfusionsschaden kommt es zu Umbauprozessen des Myokards die in ihrer Gesamtheit als kardiales Remodelling bezeichnet werden [3, 4]. Kardiales Remodelling ist ein komplexes Geschehen mit Hypertrophie und Apoptose von Kardiomyozyten, Aktivierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, Entzündungsprozessen und elektrophysiologischen Veränderungen [5-8].

Klinisch manifestiert sich kardiales Remodelling durch Veränderungen des Gewichts, der Größe, Wandstruktur und Pumpfunktion des Herzens [9, 10]. Die Gesamtheit der Veränderungen des kardialen Remodelling können zum klinischen Bild der Herzinsuffizienz führen [11, 12].

Als Herzinsuffizienz bezeichnet man das Unvermögen des Herzens die Pumpleistung an den Bedarf des Körpers anzupassen [13].

1.1 Kardiale Fibrose

Als Fibrose bezeichnet man die pathologische Ablagerung von Extrazellulärmatrix(proteinen) [14]. Man unterscheidet zwei Formen der kardialen Fibrose. Die „ersetzende/fokale“ und die interstitielle Fibrose [15]. Während die „ersetzende/fokale“ Fibrose den Untergang von Kardiomyozyten nach Ischämie-Reperfusionsschaden) kuptiert und einer Herzwandruptur vorbeugt, bildet sich die interstitielle Fibrose diffus im Myokard aus und führt zur Zunahme der Steifigkeit des Myokards und konsekutiver Abnahme der Herzleistung [16].

1.2 Myokardinfarkt und der Ischämie-Reperfusionsschaden

Die Minderdurchblutung (=Ischämie) des Myokards kann bereits nach wenigen Stunden zum nekrotischen Untergang von großen Teilen des Herzmuskels führen [17]. Die Wiederherstellung des Blutflusses (=Reperfusion) hat die Mortalität des akuten Myokardinfarkts in den letzten Jahren signifikant gesenkt [18]. Die Reperfusion vermindert zwar die Größe des Infarktareals, führt paradoxerweise jedoch ebenfalls zur Nekrose von, vor der Reperfusion unbeschädigten, Kardiomyozyten. Dieses Phänomen wurde erstmals im Jahre 1960 von Jennings et.al. beschrieben [19]. Nachfolgend wurde die Reperfusion nach Ischämie als eigenständiger Pathomechanismus erkannt. Murry et.al. konnten 1986 im Tiermodell erstmals zeigen, dass repetitive, kurze I/R Phasen (=Ischämie-Reperfusion) die Infarktgröße nach längerer Ischämie vermindern. Dieses Konzept ist als ischämische Präkonditionierung bekannt und wird aktuell in klinischen Studien (an herzchirurgischen Patienten) untersucht [20, 21].

Es ist von großer Bedeutung die Mechanismen und Einflussfaktoren des kardialen Ischämie-Reperfusionsschadens besser zu verstehen um gezielte Therapien entwickeln zu können. Hierzu eignen sich unterschiedliche Tiermodelle, wobei das Mausmodell den Vorteil der genetischen Modifikation bei relativ niedrigen Kosten bietet und (als Tiermodell) bereits seit langem etabliert ist [22, 23].

1.3 Oxidativer Stress und Redox-Homöostase

Das intrazelluläre Ungleichgewicht von oxidativen und antioxidativen Faktoren bezeichnet man als oxidativen Stress. Intrazelluläre ROS können sowohl endogenen als auch exogenen Ursprungs sein [24].

Auf der oxidativen Seite stehen Derivate molekularen Sauerstoffs mit einem höheren Reaktionspotential als molekularer Sauerstoff; sog. reaktive Sauerstoffspezies (ROS) [25]. Wichtige Vertreter reaktiver Sauerstoffspezies sind das Superoxid Radikal Anion (O_2^-), Hydrogenperoxid (HO^{\cdot}) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). ROS entstehen endogen sowohl primär als auch als Nebenprodukt der mitochondrialen Atmungskettenaktivität [26]. Die Familie der NADPH-Oxidasen (Nox1-5, Duox1 und Duox2) ist eine primäre Quelle endogenen O_2^- und H_2O_2 [27].

Diese fungieren unter kontrollierten Bedingungen als Signalmoleküle (sog. „*redox signaling*“) und beeinflussen dadurch Zellwachstum, Differenzierung und Metabolismus

[28-30]. Andererseits können exzessiv gesteigerte Spiegel von ROS sowohl indirekt, über Schäden an DNA, Proteinen und Lipiden, als auch direkt, durch Aktivierung proapoptotischer Signalkaskaden, zur Apoptose führen, aber auch zum nekrotischen Zelltod [31].

In Fibroblasten konnte die Expression von Nox4 als wichtigste NADPH-Oxidase nachgewiesen werden [32]. Nox4 scheint auch für die TGF- β 1 vermittelte Aktivierung von kardialen Fibroblasten zu Myofibroblasten notwendig zu sein [33-36].

Die wichtigsten Gegenspieler intrazellulärer ROS sind die Enzyme Superoxid-Dismutase, Katalase, die Thioredoxin Systeme und das Glutathion System. Diese lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Erstere eliminieren ROS direkt, letztere reduzieren oxidierte Biomoleküle.

Die Superoxid-Dismutase setzt O_2^- zu H_2O_2 um welches durch die Katalase anschließend zu Wasser und Sauerstoff neutralisiert werden. Die Thioredoxin Systeme und das Glutathion System dagegen reduzieren die oxidierten Cysteine von Proteinen [37].

1.4 Thioredoxin-1

Thioredoxin-1 (Trx-1) ist eine 12kDa Oxidoreduktase die zusammen mit der Trx-1-Reduktase als das Thioredoxin-1-System bekannt und in allen Säugetierzellen exprimiert ist [38]. Trx-1 weist in seiner Aminosäuresequenz fünf für seine Funktion und Regulation kritische Cysteine auf. Die beiden an den Aminosäurepositionen C32 und C35 (im Menschen) bilden durch ihre räumliche Nähe bei Oxidation eine innere Disulfidbrücke aus. Diese wird durch die Trx-1-Reduktase unter NADPH Verbrauch reduziert [39]. Ein weiteres redoxaktives Cysteinmotiv konnte an Position 62 und 69 nachgewiesen werden [40]. Dieses hat Einfluss auf die Tertiärstruktur des Proteins [41]. Für das fünfte Cystein an Position C73 konnte gezeigt werden, dass es unter stark oxidativen Bedingungen S-nitrosiert werden kann [42] was mit einer Reduktion der Enzymaktivität von Trx-1 einhergeht [41]. Zudem konnte gezeigt werden, dass Trx-1 an Cystein 69 S-nitrosiert wird und dadurch seine Aktivität gesteigert wird [43]. Neben Oxidation und S-Nitrosierung spielt auch die Nitrierung von Trx-1 eine Rolle. So konnte in Herzen nach I/R-Schaden eine erhöhte Nitrierung von Trx-1 nachgewiesen werden. Dies war assoziiert mit einer signifikanten Reduktion der Aktivität von Trx-1 [44].

Neben seiner primären enzymatischen Funktion interagiert Thioredoxin-1 auch direkt mit anderen Proteinen und nimmt so Einfluss auf Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Apoptoseinduktion [45]. Beispielsweise bindet Trx-1 im Zytosol direkt an die ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase-1) und wirkt so Apoptose inhibierend [46]. Thioredoxin-1 wird durch die lysosomale Proteinase Cathepsin D degradiert [47]. In Endothelzellen konnte in der Arbeitsgruppe Haendeler nachgewiesen werden, dass Trx-1 vor Apoptose schützt [43, 48, 49]. Dieser Apoptose-Schutz wird unter Anderem durch eine direkte Interaktion von Trx-1 mit Aktin vermittelt [50]. Die Polymerisation von Aktin-Monomeren zu Aktin-Filamenten ist essenziell für die Induktion des Myofibroblasten-Phänotyps [51]. Ausgehend von diesen Erkenntnissen wäre eine wichtige Rolle von Thioredoxin-1 in der Aktivierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten denkbar.

1.5 Der kardiale Fibroblast

Fibroblasten sind Zellen mesenchymalen Ursprungs. Sie zeigen einen schmales, flaches Zellsoma [52]. Sie exprimieren und erhalten die Integrität und Struktur der Extrazellulärmatrix [53]. Kardiale Fibroblasten spielen ebenfalls eine Rolle in der Herzentwicklung und elektromechanischen Kopplung [54, 55]. Das gesunde Herz von Ratten besteht zu 30-40 % aus Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) und 60-70 % Nicht-Kardiomyozyten [56]. Der kardiale Fibroblast hat eine Schlüsselbedeutung für die Erhaltung der Herzfunktion und für die Adaption auf pathologische Stimuli [52, 57]. Fibroblasten stehen über Integrine mit der Extrazellulärmatrix in Verbindung [58]. Integrine vermitteln mechanische Stimuli von außen in die Zelle und können so zur Aktivierung ruhender Fibroblasten zu Myofibroblasten führen [36, 59-61]. Verschiedene Stimuli führen zur Differenzierung/Phänokonversion ruhender Fibroblasten zu Myofibroblasten. Myofibroblasten sind sowohl exozytisch als auch migratorisch aktive Zellen, die im Zentrum von kardialer Fibrose stehen. Das Zytokin *Transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1) ist eines der bekanntesten Stimuli für die Differenzierung [58, 62-64].

Bisher sind keine exklusiven Marker für den Fibroblasten- und Myofibroblasten-Phänotyp etabliert. Allgemein akzeptiert wird die Identifikation des Fibroblasten-Phänotyps anhand der Expression von Vimentin bei fibroblastentypischer

Zellkonfiguration [65]. Für den Myofibroblasten Nachweis hat sich bisher die Expression von *alpha smooth muscle* Aktin (α SMA) etabliert [66, 67]. Viele andere Marker sind Gegenstand aktueller Forschung [66].

Der Myofibroblasten-Phänotyp ist im Kontrast zum ruhenden Fibroblasten ein hochaktiver Zelltyp der die Extrazellulärmatrix sowohl um- als auch aufbauen kann. Myofibroblasten zeichnen sich durch Exozytose von Matrixmetalloproteinasen, Kollagenen und Glycoproteinen aus [68, 69]. Durch die Expression von α SMA sind Myofibroblasten auf mechanische Zugbelastung stabil und können Narbengewebe aktiv kontrahieren [60, 70]. In menschlichen Post-Myokard-Infarkt Narben konnten noch nach 17 Jahren persistierende Myofibroblasten nachgewiesen werden [71].

Es konnte zudem gezeigt werden, dass Myofibroblasten an der Zellphagozytose im Rahmen des Post-Myokard-Infarkt Geschehens beteiligt sind [72] und durch Modulation von Zytokinen in ihrem Mikroumfeld Immunzellen beeinflussen [73].

Die Transdifferenzierung vom ruhenden Fibroblasten zum aktiven Myofibroblasten ist ein energieintensiver Prozess der mit erhöhter mitochondrialer Atmungskettenaktivität und erhöhtem mitochondrialem Inhalt einhergeht [74]. Es zeigte sich, dass die Inhibition des Komplexes I der Atmungskette die Myofibroblastendifferenzierung verhindert [75]. Daher könnte eine Steigerung der Atmungskettenaktivität wesentlich zur Myofibroblastendifferenzierung beitragen.

1.6 Telomere und die Telomerase

Als Telomere werden die wiederholte Sequenz 5'-TTAGGG-3' und der ihnen assoziierte Proteinkomplex Shelterin an den Enden der Chromosome bezeichnet. Aufgrund des Arbeitsmechanismus der DNA-Polymerase verkürzen sich die Telomere bei jeder Zellteilung. Als Hypothese publizierte Alexey Olovnikov dies bereits im Jahre 1971 [76, 77]. Bestätigung fand diese Theorie jedoch erst zwei Jahrzehnte später [78]. Dieser Verkürzung wirkt das Enzym Telomerase entgegen [79, 80]. Die Telomerase besteht aus einer RNA-Komponente „*telomerase RNA component*“ (TERC) [81] und der katalytischen Untereinheit Telomerase Reverse Transkriptase (TERT) [82].

Harley et al. konnten bereits 1990 zeigen, dass die Telomere in Fibroblasten sich proliferationsabhängig verkürzen. Diese Verkürzung korrelierte mit zellulärer Seneszenz

[78]. Als zelluläre Seneszenz wird die Expression eines bestimmten Genmusters [83] und der Zellzyklusarrest [84] verstanden. Re-expression der TERT führt zur Telomerverlängerung und Verhinderung der zellulären Seneszenz [85].

Im Hinblick auf das Herz zeigte sich, dass TERC-defiziente Mäuse verkürzte Telomere, eine Dilatation der Herzkammern und Herzinsuffizienz aufwiesen [86]. Die TERT transgene Tiere dagegen schützt das Herz vor Herzkammerdilatation und Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt [87, 88].

1.6.1 TERT non-kanonische Kernfunktionen

Neben seiner Telomer-verlängernden Aktivität (kanonische Funktion) wurden für die Telomerase bzw. TERT auch non-kanonische nukleäre Interaktionen nachgewiesen. So führt eine TERT Überexpression in Mausfibroblasten zu einer Herunterregulierung von Wachstumssignalen des TGF- β -Signalwegs [89]. Dies konnte auch für den Wnt- β -Catenin [90] und EGFR-Signalweg [91] gezeigt werden. Hrdlickova et al. konnten nachweisen, dass TERT die Proliferation von humanen Fibroblasten stimuliert. Diese Funktion war von der kanonischen Aktivität unabhängig [92]. Non-kanonische Funktionen von TERT spielen außerdem eine wichtige Rolle für die positiven Effekte von körperlicher Aktivität [93, 94] und die Entstehung und Erhaltung von Tumoren [95].

1.6.2 TERT non-kanonische Funktionen außerhalb des Zellkerns

Während die nukleären Funktionen von TERT bekannt und ihre Bedeutung in physiologischen und pathologischen Zuständen vielfach aufgezeigt worden ist [96], sind die extranukleären (auch nicht-kanonischen) Funktionen noch nicht vollständig geklärt [97, 98].

Unsere Arbeitsgruppe und andere konnten zeigen, dass TERT in Antwort auf oxidativen Stress vermehrt in Mitochondrien lokalisiert ist, dort die mitochondriale DNA schützt und die Produktion mitochondrialer ROS verringert bzw. die Effizienz von Komplex I der Atmungskette steigert [99, 100]. TERT moduliert außerdem die mitochondriale Gentranskription [101]. So wurde beispielsweise in Mitochondrien eine RNA-abhängige RNA-Polymeraseaktivität nachgewiesen die doppelsträngige RNA synthetisieren kann

[101]. TERT kommen also wichtige Funktionen bei Energiebereitstellung und Regulierung des Redox-Haushalt der Zelle zu. Hieraus schlussfolgernd könnte mitochondriale TERT also eine wichtige Rolle in der energieintensiven Differenzierung von kardialen Fibroblasten zu Myofibroblasten spielen.

1.7 Ziele der Arbeit

1. Welche Rolle spielt Thioredoxin-1 im Aktivierungsprozess ruhender Fibroblasten zu Myofibroblasten?
2. Welche Rolle spielt mitochondriale TERT in der Myofibroblasten-Differenzierung?
3. Gibt es einen Zusammenhang zwischen Thioredoxin-1 und mitochondrialer TERT im Rahmen der Myofibroblastendifferenzierung?

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Das verwendete Reinstwasser, im Weiteren als dH₂O oder dest. Wasser bezeichnet, wurde mit Hilfe der Filteranlage MilliQ der Firma Merck Millipore (Darmstadt) gewonnen. Alle Chemikalien waren vom Reinheitsgrad zur Analyse geeignet (p.a.).

2.2 Kommerziell erworbene Puffer, Lösungen, Reagenzien und Kits

Tabelle 1: Übersicht über kommerziell erworbene Puffer, Lösungen, Reagenzien und Kits

Puffer, Lösungen, Reagenzien und Komplett-Reagenzsysteme	Hersteller
1,4-Dithiothreit (DTT)	Carl Roth, Karlsruhe
10000 U/ml Penicillin / 10000 µg/ml Streptomycin (Pen/Strep)	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
2,7-Dichlordihydrofluoresceindiaceat (H ₂ -DCF-DA)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Acrylamid 4K-Solution (30%)-Mix 29:1	AppliChem GmbH, Darmstadt
Albumin-Fraktion V. proteasefrei (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bradfordreagenz „Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate“	BioRad, München
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe
Collagenase NB 8 Broad Range	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Desoxycholsäure Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
DNA-Größenstandard „GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder“	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
DNase/RNase freies destilliertes Wasser „Ultrapure™“	Life Technologies, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) GlutaMAX (4,5 g/l Glukose)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline, DPBS)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Einbettmedium „ProLong® Gold Antifade Mountant“	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung (1 % (v/v) in Wasser)	Carl Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (fetal calf serum, FCS)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Heparin-Natrium 25.000 IE	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Igepal CA 630	Honeywell Fluka™, Offenbach
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver (MP)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat / SDS-Pellets	Carl Roth, Karlsruhe
Orange G	Carl Roth, Karlsruhe

Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth, Karlsruhe
peqGOLD Universal-Agarose	VWR, Darmstadt
Phosphatase Inhibitor Cocktail A + B (100x)	BioTool, München
Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Protease Inhibitor Cocktail (EDTA free) (100x)	BioTool, München
Proteingrößenstandard „Precision Plus Protein™ Standard Kaleidoscope™	BioRad, München
Rekombinantes humanes TGF-β1	Peprtech, Hamburg
RNA Gel loading Dye (6x)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Röntgen-Entwickler-Konzentrat	Adefo, Dietzenbach
Röntgen-Fixierer-Konzentrat	Adefo, Dietzenbach
RQ1 RNase – Free DNase Kit	Promega, Mannheim
Salzsäure (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe
SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Trichlormethan / Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS-hydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Triton® X-100	Honeywell Fluka™, Offenbach
TRIzol™ reagent	Life Technologies/Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA (0,5 g/l in DPBS) 10x, ohne Phenolrot	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
UltraPure™ (DNase/RNase free) Agarose	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

Tabelle 2: Übersicht über die im Western Blot-Verfahren verwendeten Antikörper

Antigen	Spezies	Hersteller
<i>alpha-smooth-muscle</i> Actin	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
Vimentin	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
Thioredoxin-1	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
Src	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
Anti-Kaninchen-IgG (Meerrettichperoxidase-gekoppelt)	Esel	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg

Tabelle 3: Übersicht über die im Immunofluoreszenzverfahren verwendeten Antikörper

Antigen	Spezies	Hersteller
Anti-smooth-muscle-Actine 1A4 (Alexa Fluor® 594)	Maus	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Vimentin (D21H3) (Alexa Fluor® 488)	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK

2.3 Labormaterialien und Geräte

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav "Systec DX-150"	Systec, Linden
Autoklav „Varioklav“	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Autoradiographie Kassette	Carl Roth, Karlsruhe
AxioCam MRm	Zeiss, Jena

CO ₂ -Inkubator „HERAcell® 240i“	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Elektrophoresis Power Supply	PeqLab, Erlangen
FACS Calibur™ Durchflusszytometer	BD, Franklin Lakes
Fluoreszenzmikroskop „Axio Observer.D1“	Zeiss, Jena
Geldokumentationssystem „INTAS Gel iX Imager“	Royal Biotech, Frankfurt
Kühlzentrifuge „5810“	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge „Rotina 420R“	Hettich, Tuttlingen
Lichtmikroskop „CKX31“	Olympus, Hamburg
Magnetrührer „yellow line MSC basic c“	IKA, Staufen
Mini-PROTEAN® Tetra Electrophoresis System	BioRad, München
MyCycler™ Thermal Cycler	BioRad, München
Neubauer Zählkammer	Marienfeld-Superior, Lauda Königshofen
Orbitalschüttler „HS 260 basic“	IKA, Staufen
pH-Meter „SevenGo™“	Mettler Toledo, Schwerzenbach, Schweiz
Pipette BioPette ^{PLUS}	Labnet, Edison, USA
Pipettierhilfe „Pipetus®“	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
SmartSpec Plus Spectrophotometer	BioRad, München
Spannungsquelle „Power Pac 1000“ und „Power Pac 200“	BioRad, München
Sterilwerkbank „HERAsafe®“	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
UV-Spektrophotometer „NanoDrop™ 2000c“	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Vakuumpumpe „WP6122050“	Merck Millipore, Darmstadt
Vortexer „REAX top“	Heidolph, Schwabach
Waage „440-43N“	Kern & Sohn GmbH, Baldingen- Frommern
Waage „CP 124s“	Satorius, Göttingen

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Labormaterialien

Material	Hersteller
0,2 ml Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg
1,5 ml Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg
15 ml Reaktionsgefäß	TPP, Trasadingen, Schweiz
2 ml Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg
50 ml Reaktionsgefäß	TPP, Trasadingen, Schweiz
6-well-Platte	Greiner bio-one, Frickenhausen
Deckgläschen (24mm x 24mm)	Carl Roth, Karlsruhe
Einmalpipette (1ml)	Carl Roth, Karlsruhe
FACS Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Kryoröhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Petrischalen 10 cm	Greiner bio-one, Frickenhausen
Petrischalen 6cm	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen für BioPette ^{PLUS} (blau, gelb, weiß, mit/ohne Filter)	STARLAB GmbH, Hamburg
Plastikküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-membran „Immobilion-P“ Porengröße 0,45 µm	Merck Millipore, Darmstadt
Röntgenfilme „Amersham HyperFilm™ ECL“	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
Serologische Pipetten (2ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
T25 Zellkulturflasche „CELLSTAR®“	Greiner bio-one, Frickenhausen
T75 Zellkulturflasche „CELLSTAR®“	Greiner bio-one, Frickenhausen

Whatman™-Filterpapier	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
Zellkulturschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.4 Tiermodelle und genetischer Hintergrund

Die Ausgangslinie der TERT-defizienten Mäuse ist von The Jackson Laboratories (<https://www.jax.org/strain/005423>). Sie wurden vom gemischten B6.129S Background für mehr als 15 Generationen auf C57Bl/6N zurückgekreuzt. Die weiteren Genotypen wurden von Herrn PD Dr. Joachim Altschmied zur Verfügung gestellt. Untersucht wurden Zellen aus Mäusen dreier Genotypen. Wildtyp Mäuse (TERT +/+) in denen TERT sowohl nukleär als auch mitochondriell lokalisiert ist. MitoTERT Mäuse in deren Zellen TERT ausschließlich in Mitochondrien lokalisiert ist und (TERT -/-) Mäuse die ubiquitär TERT-defizient sind.

2.5 Tierexperimentelle Genehmigung

Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz (LANUV) Aktenzeichen: AZ 84-02.05.50.15.023

2.6 Zellbiologische Methoden

Sämtliche im Weiteren beschriebenen zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Chemikalien, Medien und Zusätze wurden ausschließlich unter der Sterilwerkbank geöffnet und vor Verwendung gegebenenfalls autoklaviert oder steril filtriert.

2.6.1 Isolation von kardialen Fibroblasten

Tabelle 6: Zur Isolation verwendete Lösungen und Medien

Lösung/Medium	Zusammensetzung
Kollagenase-Lösung	1 Unit/ml (w/v) Collagenase NB 8 Broad Range (steril filtriert), Cat. No. 17456, Serva Electrophoresis, Heidelberg
Heparin-Spüllösung	1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin 10 % (v/v) Heparin-Natrium 25.0000
Isoliermedium	DMEM-GlutaMAX (4,5 g/l Glukose) 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (100 U/ml Penicillin, 100 µg/µl Streptomycin) 20 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS (fetal calf serum) (Inaktiviert für 45 Minuten bei 56 °C)

Kultivierungsmedium	DMEM-GlutaMAX (4,5 g/l Glukose) 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (100 U/ml Penicillin, 100 µg/µl Streptomycin) 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS (fetal calf serum) (Inaktiviert für 45 Minuten bei 56 °C)
Trypsin-Lösung	10 % (v/v) Trypsin-EDTA (0,5 g/l in DPBS) 10x

Das Versuchstier wurde durch zervikale Dislokation getötet, mit Ethanol desinfiziert und anschließend unter der Sterilwerkbank mit sterilem Operationsbesteck präpariert. Es erfolgte ein medianer Hautschnitt und stumpfe Präparation auf das parietale Peritonealblatt. Unter Meidung eines Darmkontakts wurde subchondral die Peritonealhöhle eröffnet und das Diaphragma an seiner ventrolateralen Ansatzfläche vom knöchernen Thorax getrennt. Durch Abklappen des knöchernen Brustkorbs nach kranial und anschließender Abtrennung gelang der Zugang zur Thoraxhöhle.

Der linke Ventrikel wurde mit einer 27G Kanüle punktiert und für eine Minute mit 1 ml Heparin-Spüllösung perfundiert. Nach 30 Sekunden wurde der rechte Ventrikel per Inzision entlastet.

Nach Perfusion wurde das Herz durch abtrennen am Gefäßstiel gelöst und in einer 10 cm Zellkulturschale manuell entblutet. Nach scharfer Abtrennung aller makroskopisch sichtbaren Fett-, Bindegewebs-, und Gefäßanteile wurde das Herz in einer weiteren 10 cm Zellkulturschale mit sterilen Skalpell in möglichst kleine Stücke zerschnitten und auf zwei 2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt.

Die Herzstücke wurden mit 1 ml Kollagenase-Lösung für 15 Minuten im Heizblock bei 37 °C und 800 Umdrehungen/Minute inkubiert. Der Überstand wurde in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml Isoliermedium versetzt und 5 Minuten bei 10 °C und 0,5 xg zentrifugiert. Die verbleibenden Herzstückchen wurden mit 1 ml Kollagenase-Lösung in einem weiteren Zyklus verdaut.

Aus dem Zentrifugat wurde der Überstand aus den ersten beiden Zyklen verworfen und die Zellpellets in 1 ml Isoliermedium auf Eis gelegt. Ab dem dritten Zyklus wurde der Überstand aus dem Zentrifugat ein zweites Mal bei unveränderten Bedingungen zentrifugiert und das Zellpellet dem entsprechenden Reaktionsgefäß des Zyklus hinzugefügt.

Dieser Zyklus, bestehend aus 15 Minuten Verdau und 5 Minuten Überstand-Zentrifugation, wurde solange wiederholt bis makroskopisch keine Herzstücke mehr vorhanden waren. Dies dauerte 6 Zyklen.

Die gesammelten Zellpellets wurden dann auf eine 10 cm Zellkulturschale ausgebracht in die 10 ml Isoliermedium vorgelegt wurde und für zwei Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Hiernach folgte ein Absaugen des Mediums und zweimaliges, vorsichtiges waschen mit Kultivierungsmedium um nicht adhärente Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml Kultivierungsmedium bis zur Subkonfluenz bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert.

2.6.2 Kultivierung von kardialen Fibroblasten

Die kardialen Fibroblasten wurden nach zwei Tagen mit Kultivierungsmedium zweimal gewaschen und mit frischem Kultivierungsmedium weiter inkubiert. Der Mediumwechsel und Waschschrift diente der Entfernung von unerwünschten, nicht adhärenen und abgestorbenen Zellen. Weiter wurde alle zwei Tage das Kultivierungsmedium gewechselt, ohne dabei zu Waschen, und täglich eine mikroskopische Kontrolle auf Subkonfluenz (70 – 80 % Konfluenz) durchgeführt.

2.6.3 Passagieren der Fibroblasten

Bei Erreichen der Subkonfluenz wurden die Fibroblasten in 75 cm² Zellkulturflaschen überführt. Dazu wurde das Kultivierungsmedium aus der Zellkulturschale abgesaugt, die Zellen mit DPBS gewaschen und anschließend mit 1%iger-Trypsin-EDTA-Lösung vom Zellkulturschalenboden abgelöst. Hierbei wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und mikroskopisch auf Ablösung kontrolliert. Bei Ablösung von mindestens 80 % der Zellen wurde die Trypsinierung mit der fünffachen Menge Kultivierungsmedium abgestoppt. Danach wurden die Zellen wie in (2.6.4) beschrieben gezählt und mit einer definierten Zellzahl in neue Zellkulturflasche mit einer entsprechen Menge Kultivierungsmedium überführt.

In 75 cm² Zellkulturflaschen wurde jeweils Kultivierungsmedium vorgelegt. Abhängig vom Genotyp wurden 3 x 10⁵ bis 4 x 10⁵ Zellen pro 75 cm² Zellkulturflasche ausgebracht und bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zur Subkonfluenz inkubiert.

2.6.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer Zählkammer vorbereitet und mit Zellsuspension befüllt. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops wurden die vier großen Eckquadrate einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Da diese ein definiertes Volumen von 10^{-4} ml besitzen, konnte die Zellzahl anhand der folgenden Formel berechnet werden:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{\text{gezählte Zellzahl in } n \text{ Eckquadraten}}{n \text{ Eckquadrate}} \times 10^4 / \text{ml}$$

2.6.5 TGF- β 1 Behandlung der Zellen

Zu Versuchsbeginn wurden 1×10^5 Zellen pro 6 cm Zellkulturschale in Kultivierungsmedium ausgebracht und entsprechend (Kap. 3.3) mit TGF- β 1 behandelt.

2.6.6 Zellernte

Zur Ernte der Zellen wurden die Zellkulturschalen auf Eis gekühlt und die adhärennten Zellen im Medium mit einem geeigneten Zellschaber vom Boden gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein gekühltes Reaktionsgefäß überführt. Zur möglichst vollständigen Ernte der Zellen wurden die Zellkulturschalen dann mit gekühltem DPBS gewaschen und die Zellsuspension ebenfalls zum Reaktionsgefäß hinzugefügt. Zum Pelletieren der Zellen wurden diese bei 2.200 xg in 4 °C für 7 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in kaltem DPBS resuspendiert und in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde die Zellsuspension erneut mit denselben Parametern zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet entweder direkt lysiert oder bei -80 °C für eine spätere Fortführung des Experiments, gelagert.

2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.7.1 Lyse von Zellen mit RIPA-Puffer

Tabelle 7: Für die Zellyse verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung
RIPA (Radioimmunoprecipitation-assay)-Puffer	50 mM TRIS-HCl pH 8,0 1 % (v/v) Ipegal CA 630 150 mM NaCl 0,1 % (w/v) SDS 0,5 % (w/v) Desoxycholol

Zur Lyse der Zellen wurden die Zellpellets in RIPA-(*radioimmunoprecipitation-assay*) - Puffer resuspendiert. Das Volumen des RIPA-Puffers entsprach dem zwei- bis dreifachen Volumen des Zellpellets. Dem Puffer wurden Protease- und Phosphataseinhibitoren entsprechend der Angaben des Herstellers zugegeben. Nach 30 Minuten Lyse auf Eis wurden die Lysate bei 16.000 xg in 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde zur anschließenden Testung in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, das Zelldebris-Pellet verworfen.

2.7.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Um die Proteinkonzentration zu bestimmen wurde das Lysat in einer Plastikkuvette 1:800 mit H₂O verdünnt. Das Bradfordreagenz wurde anschließend 1:5 zum verdünnten Lysat gegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die photometrische Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm. Anhand der Messwerte und einer zuvor erstellten Kalibrierungsgeraden wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

2.7.3 Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*) - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Tabelle 8: Zur SDS-PAGE verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Proteinprobenpuffer (5x)	312,5 mM TRIS-HCl pH 6,8 10 % (w/v) SDS 50 % (v/v) Glycerin 250 mM DTT 0,05 % Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer	25 mM TRIS 0,1 % (w/v) SDS 192 mM Glycin

Tabelle 9: Zusammensetzung der verwendeten Gele zur SDS-PAGE

Komponente	Trenngel (10 %)	Trenngel (14 %)	Sammelgel (5 %)
Acrylamid 4K-Solution (30%)-Mix 29:1	10 % (v/v)	14 % (v/v)	5 % (v/v)
TRIS-HCl (pH 8,8)	390 mM	390 mM	-
TRIS-HCl (pH 6,8)	-	-	126 mM
SDS	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)
APS	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)
TEMED	0,04 % (v/v)	0,04 % (v/v)	0,1 % (v/v)

Die Auftrennung der Protein-Fractionen bei der SDS-PAGE erfolgte nach ihrem Molekulargewicht in einer vertikal gelagerten Elektrophoresekammer. Das zur Auftrennung der Proteine verwendete Polyacrylamidgel wies, je nach Anteil der Polyacrylamid-Bisacrylamidmenge, eine nach Porengröße definierte Gitternetzstruktur auf. Die Gele wurden in der in Tabelle 9 zu entnehmenden Zusammensetzung präpariert. Die Auftrennung in diesem Gel erfolgte dann durch Anlegen einer elektrischen Spannung entsprechend der, durch das SDS (Natriumdodecylsulfat / *sodium dodecyl sulfate*) negativ geladenen Proteine, nach ihrer Größe.

Die jeweils gewünschte Proteinmenge wurde mit auf einfach verdünntem Proteinprobenpuffer versetzt und das Volumen der einzelnen Proben durch RIPA-Puffer angeglichen. Direkt vor Durchführung der Elektrophorese wurden die Proben für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert.

Nach Einpipettieren der Proben in die Geltaschen wurden diese bei einer effektiven Feldstärke von 1-2 Volt/cm² im 5 %-igen Sammelgel konzentriert und anschließend im nachfolgenden Trenngel aufgetrennt. Abhängig von der zu detektierenden Proteingröße wurden Trenngele mit Prozentigkeiten von 10 % oder 14 % hergestellt. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde der Proteingrößenstandard Precision Plus Protein™ Standard Kaleidoscope™ von BioRad aufgetragen. Nach erfolgter Auftrennung wurde das Trenngel für ein Western-Blot mit anschließender Immundetektion verwendet (Kap. 2.7.4).

2.7.4 Western-Blot mit anschließender Immundetektion

Tabelle 10: Für das Western-Blotting verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Blockierungslösung	5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T
Transferpuffer mit SDS	48 mM TRIS-Base 386 mM Glycin 0,05 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Methanol
Transferpuffer ohne SDS	24 mM TRIS-Base 193 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
TRIS-gepufferte Salzlösung + Tween®-20 (TBS-T)	50 mM TRIS-Base 150 mM NaCl 5 mM KCl 0,1 % (v/v) Tween®-20
Antikörper-Puffer	1 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T

Das Western-Blot Verfahren dient der Übertragung der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Membran. Hierbei kam eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran zur Verwendung. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung wurden die Proteine vom Trenngel auf die Membran übertragen. Zuerst wurde die PVDF-Membran durch Inkubation in Methanol über eine Minute aktiviert und anschließend kurz mit dest. Wasser gewaschen. Das Gel, PVDF-Membran, Whatman™-Filterpapier und Blot-Schwämme wurden in entsprechendem Transferpuffer equilibriert und anschließend in folgender Reihenfolge zusammengesetzt. Blot-Schwamm, Whatman-Filterpapier, Gel, PVDF-Membran, Whatman-Papier, Blot Schwamm. Der elektrophoretische Transfer erfolgte im Eisbad für 60 Minuten bei 100 V. Als Blot-Methode wurde hierbei das Tank-Blot-Verfahren verwendet.

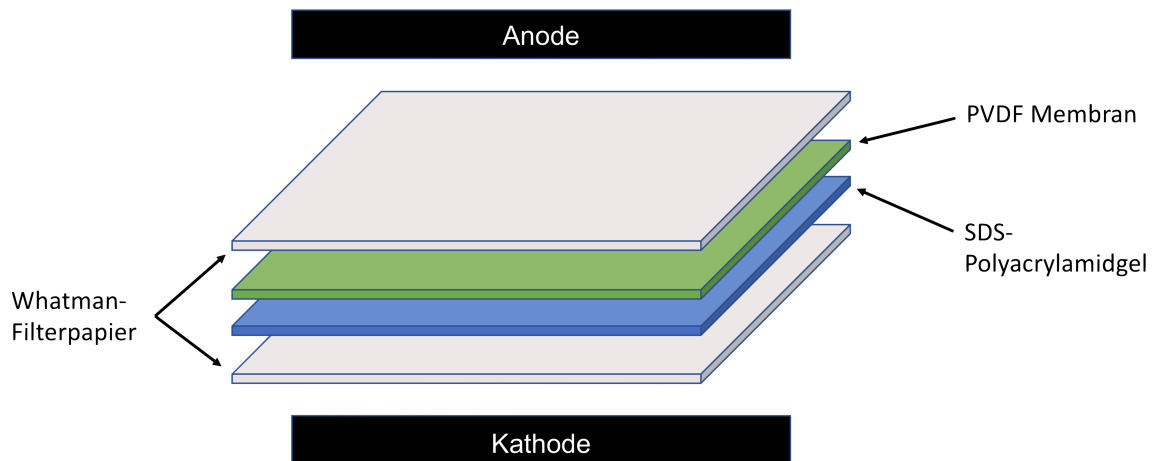


Abb. 1: Schematischer Aufbau des Western Blot.

Im Anschluss an den Transfer musste vor Detektion der Proteine mit Hilfe von Antikörpern eine Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durchgeführt werden. Hierzu wurde die Membran in 5 % (w/v) Magermilchpulver in TRIS gepufferte Salzlösung mit Tween®-20 (TBS-T) bei Raumtemperatur 80 Umdrehungen/Minute auf einem Orbitalschüttler für 60 Minuten inkubiert. Im Anschluss folgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper. Dieser wurde in 1 % (w/v) Magermilchpulver verdünnt, auf die Membran pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend folgten drei Wasch-Schritte mit TBS-T bei 60 Umdrehungen/Minute auf dem Orbitalschüttler um ungebundene Primärantikörper zu entfernen. Der verwendete Sekundärantikörper richtete sich gegen die jeweilige Spezies in der der Primärantikörper generiert worden war. An den Sekundärantikörper ist eine Meerrettichperoxidase

gekoppelt. Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls in 1 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T verdünnt. Anschließend wurde die Membran mit der Sekundärantikörperlösung für 120 Minuten bei Raumtemperatur 60 Umdrehungen/Minute auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Es folgten erneut drei Wasch-Schritte wie zuvor beschrieben. Zum Nachweis der Antikörperbindung wurde Pierce™ Enhanced Chemoluminescence (ECL) Western Blotting Substrate von Thermo Fisher Scientific nach Angaben des Herstellers verwendet. Bei Umsetzung des Substrates durch die Meerrettichperoxidase entsteht ein Lichtsignal, welches in einer Autoradiographie-Kassette mit einem Röntgenfilm detektiert wurde. Die Exposition der Membran mit dem Röntgenfilm sowie die Entwicklung desselben erfolgten in einer Dunkelkammer. Die anschließende semiquantitative Analyse der detektierten Signale erfolgte mit dem Programm ImageJ (Version 1.46r). Zur statistischen Auswertung kam ein zweiseitiger, gepaarter Student's T-Test zu Einsatz.

2.7.5 Immunfluoreszenzfärbung

Tabelle 11: Verwendete Puffer und Lösungen in der Immunfluoreszenzfärbung

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Fixierlösung	4 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA)
Block-Puffer	3 % (w/v) Rinderalbumin (bovine serum albumin, BSA) 0,3 % (v/v) Triton®-X-100 → gelöst in DPBS
Antikörper-Puffer	1 % (w/v) Rinderalbumin (<i>bovine serum albumin</i> , BSA) in DPBS
DAPI-Lösung	2 mg/ml 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in Dimethylformamid (DMF)

2.7.5.1 Ausbringen und kultivieren der Zellen auf Deckgläschen

Zur Darstellung intrazellulärer Zytoskelettproteine mittels Immunfluoreszenz –Technik wurden in einer 6-well-Platte 5×10^4 Zellen pro well auf Deckgläschen ausgebracht. Anschließend wurde mit den Zellen wie in Kap. 2.6.5 beschrieben weiterverfahren.

2.7.5.2 Fixierung der Zellen

Um die Zellen zu fixieren wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 4% (v/v) Paraformaldehyd-(PFA)-

Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen der PFA-Lösung wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen.

2.7.5.3 Permeabilisierung und Antikörperinkubation

Die Zellen wurden mit Block-Puffer für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellmembran zu permeabilisieren und unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Hiernach folgte zweimaliges Waschen mit DPBS.

Um die gewünschten Proteine fluoreszenzmikroskopisch nachzuweisen, wurden mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierte Antikörper verwendet. Dazu wurden die Zellen mit den konjugierten Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden lichtgeschützt durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in beschriebener Weise mit DPBS gewaschen. Zur Anfärbung der Zellkerne wurden die Zellen in DAPI-Lösung mit einer Endkonzentration von 200 ng/ml für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal für je 5 min mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen mit Prolong™ Antifade Gold Reagent auf Objektträgern eingebettet. Bis zur Aushärtung des Eindeckmittels wurden die Objektträger vor Licht geschützt bei 4 °C gelagert. Zur luftdichten Versiegelung wurde handelsüblicher durchsichtiger Nagellack in einem schmalen Streifen an den Kanten der Deckgläschen aufgetragen.

2.7.5.4 Mikroskopische Immunfluoreszenzaufnahmen

Zur Aufnahme der Bilder wurde ein Zeiss Axio Observer.D1 mit einer angeschlossenen AxioCam MRm verwendet. Von jeder Behandlung und Genotyp wurden 10 Aufnahmen mit einer 20-fachen Vergrößerung an zufälligen Stellen aufgenommen. Die Aufnahmen erfolgten mit gleichbleibenden Belichtungszeiten über eine Serie hinweg mit der Software AxioVision 4.8.2.0 von Carl Zeiss.

Zur Auswertung wurden die einzelnen Farbkanäle als TIFF-Graustufen-Dateien extrahiert und anschließend die gemessenen Kanalintensitäten durch die Zahl der jeweils ausgezählten Zellkerne geteilt. Das Ergebnis gibt in arbiträren Einheiten die Intensität des gemessenen Fluoreszenzsignals pro Zelle an. Dieses gibt Auskunft über die relative Expression des durch den fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörper gebundenen Proteins an. Die DAPI Zellkernfärbung beruht auf der Einlagerung des

Fluoreszenzfarbstoffs in AT-reiche Regionen der DNA. Die anschließende Analyse der detektierten Signale erfolgte mit dem Programm ImageJ (Version 1.46r).

2.7.6 Durchflusszytometrische Messung reaktiver Sauerstoffspezies

Tabelle 12: Zur ROS Messung verwendeter Farbstoff

Lösung	Zusammensetzung
Dichlorfluorescein (DCF)-Lösung	H ₂ -DCF-DA 10 mM in Dimethylsulfoxid (DMSO)

Zur Messung der intrazellulären Sauerstoffspezies wurde der fluoreszierende Farbstoff H₂-DCF-DA verwendet. Dieser ist zellmembrangängig und wird von zellulären Esterasen deacetyliert, wodurch das entstandene H₂-DCF intrazellulär verbleibt. Reaktive Sauerstoffspezies oxidieren dieses nun zum fluoreszierenden Dichlorfluorescein (DCF). Bei Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm kann ein Emissionssignal mit Wellenlänge 525 nm in einem Durchflusszytometer gemessen werden. Das Fluoreszenzsignal ist somit ein Maß für die intrazellulär gebildeten Sauerstoffspezies [102].

Dafür wurden 1×10^5 Zellen pro 6 cm Zellkulturschale ausgebracht und wie in Kap. 2.6.5 beschrieben, behandelt. Danach wurden die Zellen mit H₂-DCF-DA (Endkonzentration 10 μ M) für 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Kontrollen wurden mit einem äquivalenten Volumen DMSO behandelt. Hiernach folgte ein zügiges Absaugen des Mediums und nachfolgendes Waschen der Zellen mit DPBS. Nach Absaugen des DPBS wurden die Zellen mit Trypsin-Lösung für 5 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um sie von der Zellkulturschale zu lösen. Bei 80 – 90 %iger Ablösung der Zellen von der Zellkulturschale wurde die Trypsinierung mit der dreifachen Menge, der vorher eingesetzten Trypsin-Lösung, 10 % (v/v) FCS in DPBS-Lösung abgestoppt. Anschließend wurden die Zellen mit einer 1 ml Einmal-Pipette durch resuspendieren sorgfältig von der Zellkulturschale gespült und in ein FACS-Röhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation von 5 Minuten bei 2.200 xg und 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Pellet in DPBS resuspendiert. Es folgte die zügige Messung des Fluoreszenzsignals mit dem Durchflusszytometer FACS Calibur™. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit dem Programm FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, USA).

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 RNA-Isolation

Um eine Degradation von RNA während der Isolation zu vermeiden, wurde diese unter RNase freien Bedingungen durchgeführt.

Die RNA wurde mit der Trizol-Methode aus Zellpellets nach einem modifizierten Protokoll von Chomczynski und Sacchi durchgeführt [103]. Zu Beginn wurde das Zellpellet (siehe Kap. 2.6.6) zur Lyse in einer von der Pelletgröße abhängigen Menge TRIzol® (Life Technologies, Darmstadt) resuspendiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 1/5 des Volumens Wasser-gesättigtes Chloroform zugegeben und das Reaktionsgefäß für 15 Sekunden per Hand geschüttelt. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur von 3 Minuten und nachfolgend eine erste Zentrifugation bei 12.000 xg und 4 °C für 15 Minuten. Hierbei bildeten sich drei Phasen, wobei die oberste wässrige Phase die RNA enthielt. Die oberste Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der RNA mit einem Volumen, das dem halben Volumen des zuvor eingesetzten TRIzols entsprach, versetzt. Nach mehrfachem Invertieren des Reaktionsgefäßes folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 10 Minuten mit nachfolgender Zentrifugation bei 12.000 xg und 4 °C für weitere 10 Minuten. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das sedimentierte RNA-Pellet zur Entfernung des Isopropanols mit 75 %igem Ethanol entsprechend dem doppelten Volumen des vorher eingesetzten Isopropanols versetzt, auf dem Vortex-Mixer durchmischt und anschließend bei 7.500 xg und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dann sorgfältig abgenommen, verworfen und das RNA-Pellet im geöffneten Reaktionsgefäß auf dem Heizblock bei 37 °C getrocknet. Danach wurde die RNA, abhängig von der Größe des Pellets, in 20 – 30 μl RNase freiem Wasser resuspendiert. Das folgende Inkubieren der RNA-Suspension bei 55 °C für 10 Minuten im Heizblock sollte für eine bessere Lösung des RNA-Pellets sorgen. Anschließend folgte die Messung der RNA Konzentration per Photometrie (Kap. 2.8.2) und die gelelektrophoretische Kontrolle (Kap. 2.8.6) um die RNA auf Degradation zu überprüfen. Bei Integrität der isolierten RNA sind zwei deutlich getrennte Banden im Gel detektierbar; dies sind die 28S und 18S ribosomale RNA.

2.8.2 Photometrische Quantifizierung der RNA-Konzentration

Für die Quantifizierung der isolierten RNA wurde ein NanoDrop™ 2000c UV-Spektrophotometer verwendet. Das Messprinzip beruht auf der Absorption von Licht. Für Nukleinsäuren liegt das Absorptionsmaximum bei 260 nm. Unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes lässt sich die Konzentration der RNA in der vorliegenden Probe errechnen, dabei entspricht eine Absorption von 1 bei 260 nm einer Konzentration von 40 ng/µl. Zur Bestimmung der Reinheit der Probe wird das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm (A_{260}) und 280 nm (A_{280}) herangezogen. Für „reine“ RNA gilt ein Verhältnis ($A_{260}/280$) von ~ 2,0 als allgemein akzeptierter Richtwert.

2.8.3 DNase Verdau der RNA

Um mögliche DNA Reste in der isolierten RNA zu entfernen wurde vor der reversen Transkription ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurde ein kommerzielles Kit (RQ1 RNase – Free DNase Kit, Promega, Mannheim) verwendet und 5 µg RNA für den DNase Verdau eingesetzt. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde der DNase Verdau in 20 µl Volumen und mit 5 µl DNase durchgeführt.

2.8.4 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription schreibt eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) eine einzelsträngige RNA-Matrize in den komplementären DNA-Strang (cDNA) um.

Hierfür wurde das SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR von Thermo Fisher Scientific/Invitrogen™ verwendet.

Die Reverse Transkription wurde nach Herstellerangaben mit 1,4 µg DNase verdauter RNA durchgeführt.

Abweichend vom Herstellprotokoll wurden sowohl oligo (dT)₂₀ als auch *random hexamers* (pdN₆) eingesetzt. Nach Zugabe des cDNA Synthesis Mix wurde, vor der 50 minütigen Inkubation bei 50 °C, während der die cDNA Synthese stattfindet, zunächst 10 Minuten auf 25 °C erhitzt. Die erzeugte cDNA wurde anschließend als Matrize in der semiquantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (Kap. 2.8.5) verwendet.

2.8.5 Semiquantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*semiquantitative real-time polymerase chain reaction*)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der exponentiellen Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz. Initial wird der Reaktionsansatz für 5 Minuten auf 94 °C erhitzt. Anschließend folgen zyklische Wiederholungen dreier Schritte. Zuerst werden die Nukleinsäuren bei 94 °C denaturiert, anschließend folgt der Annealingschritt bei 60 °C in dem die Primer, die den zu amplifizierenden Sequenzabschnitt begrenzen, an den komplementären DNA Strang binden. Abschließend folgt der Elongationsschritt bei 72 °C, der optimalen Temperatur für die Aktivität der hitzestabile DNA-Polymerase; in diesem Schritt werden die Primer an ihren 3'-Enden verlängert.

Bei der hier beschriebenen semiquantitativen PCR wird SYBR-Green, ein in den DNA-Doppelstrang interkalierender Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt, wobei die Fluoreszenz nach DNA Bindung um Größenordnungen höher ist als die des freien Farbstoffs. Damit kann die zyklische Messung der Fluoreszenz als Maß für die entstandene Menge des Amplifikationsproduktes genutzt werden, welche wiederum einen Rückschluss auf die zu Beginn vorliegende Menge der cDNA des zu untersuchenden Transkripts erlaubt. Der Vergleich mit der Amplifikation eines Sequenzabschnitts einer cDNA, die dem Transkript eines Gens entstammt, dessen Expression sich unter den experimentellen Bedingungen nicht ändert (Haushaltsgen, *housekeeping gene*), lässt dann Rückschlüsse auf die relative Expression des zu untersuchenden Gens (Zielgen) zu.

Als Ergebnis derartiger PCR-Läufe erhält man Amplifikationskurven in denen die gemessene Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl aufgetragen ist. Der Amplifikationszyklus ab dem das Fluoreszenzsignal einen festgelegten Schwellenwert überschreitet wird als Ct-Wert (*cycle threshold*) bezeichnet. Der Schwellenwert (*threshold*) wird so gewählt, dass er am Beginn der messbaren exponentiellen Amplifikation liegt. Anschließend kann die Differenz der Ct-Werte von Zielgen und Haushaltsgen (ΔCt) als Maß für die relative Expression des Zielgens ermittelt werden. Die Differenz der ΔCt zweier unterschiedlicher Versuchsbedingungen (bspw. mit bzw. ohne TGF- β 1 Behandlung) wird als $\Delta\Delta Ct$ angegeben und ermöglicht die Ermittlung der Veränderung der Expression des Zielgens [104]. Als Haushaltsgen wurde das Gen für das ribosomale Protein L32 (RPL32) verwendet.

Tabelle 16: Reaktionsansatz der semiquantitativen Echtzeit-PCR

Komponente	Volumen	Endkonzentration
cDNA	2 µl	-
2x <i>Biotool™ SYBR Green Master Mix</i>	10 µl	1 x
<i>Forward Primer</i> (10 µM)	1 µl	0,5 µM
<i>Reverse Primer</i> (10 µM)	1 µl	0,5 µM
dH ₂ O	ad 20 µl	-

Tabelle 17: PCR-Programm zur Amplifikation der cDNA

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
<i>Hot start</i>	94 °C	5 Minute	1 x
Denaturierung	94 °C	30 Sekunden	50 x
<i>Annealing</i>	60 °C	15 Sekunden	
Elongation	72 °C	20 Sekunden	

Die verwendeten *primer* wurden unter Zuhilfenahme des Online-Tools „Primer BLAST“ entworfen [105].

Tabelle 18: Zur Amplifikation von cDNA verwendete DNA-Oligonukleotid-Primer

Primer	Gen	Sequenz (5' -> 3')
mTXN1 Ex02 for1	Thioredoxin-1	5' GCTTGTCGTGGTGGACTTCT 3'
mTXN1 Ex04/05 rev1		5' AACTCCCCCACCTTTTGACC 3'
mMMP2 Ex05/06 for	MMP2	5'CCCCATGAAGCCTTGTTTACC 3'
mMMP2 Ex07 rev		5'ACATGGGGCACCTTCTGAAT 3'
mNOTCH1 Ex24 for1	NOTCH-1	5' CGCCC GTGGATTCATCTGTA 3'
mNOTCH1 Ex25 rev1		5' CAGGTGCCCTGATTGTAGCA 3'
hmRPL32 Ex02 for	Ribosomal Protein	5' GTGAAGCCCAAGATCGTCAA 3'
hmRPL32 Ex03 rev	L32	5' TTGTTGCACATCAGCAGCAC 3'

Zu Zwecken der internen Qualitätskontrolle wurde stets ein technisches Duplikat des Ansatzes durchgeführt. Die interne Qualitätsgrenze wurde bei einer Abweichung der Ct-Werte von 0,5 Zyklen festgelegt. Außerdem wurde das Amplifikat in einer Agarose-Gelelektrophorese auf Amplifikation der erwarteten Sequenzlänge und Ausschluss unspezifischer Banden geprüft (Kap. 2.8.6).

2.8.6 Agarose-Gelelektrophorese

2.8.7 Medien und Puffer

Tabelle 19: Verwendete Puffer und Reagenzien

Puffer/Reagenzien	Zusammensetzung/Hersteller
DNA-Ladepuffer (6x)	0,1% (w/v) Orange G 0,1% (w/v) Xylencyanol 10 mM TRIS-HCl (pH 7,6) 10 mM EDTA 40% (v/v) Glycerin

RNA Gel loading Dye (6x)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Laufpuffer TRIS-Acetat EDTA-Puffer (TAE) 1x	40 mM TRIS-Base 0,1 % (v/v) Essigsäure 1 mM EDTA pH 8,3

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäuren in einem Agarosegel entlang eines elektrischen Feldes. Hierbei macht man sich die negative Nettoladung von DNA und RNA zu Nutze. Agarose-Gelelektrophoresen wurden sowohl zur Überprüfung der Amplifikationsprodukte der semiquantitativen Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (Kap. 2.8.5) als auch zur Überprüfung der Integrität isolierter RNA (Kap. 2.8.1) eingesetzt.

Zur Herstellung von 1,0 - 1,5 % (w/v)-igen Agarosegelen wurde die benötigte Menge Agarosepulver mit 1x TAE-Puffer gemischt und in der Mikrowelle erhitzt bis die Agarose komplett gelöst war. Nach anschließender Abkühlung auf ca. 55 °C wurde Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben. Die noch flüssige Agaroselösung wurde in einen Gelschlitten gegossen und ein Kamm als Platzhalter für die Geltaschen eingesetzt. Nach Erstarren des Agarosegels wurde dieses in eine Flachbett-Elektrophoreseapparatur eingesetzt, mit 1x TAE-Puffer überschichtet und der Kamm aus dem Agarosegel entfernt.

Die Proben wurden mit einem Fünftel ihres Volumens an DNA-Ladepuffer (6x) oder *RNA Gel loading Dye* (6x) versetzt und in die Geltaschen geladen. Eine parallel mitlaufende Probe von DNA Fragmenten definierter Größe (GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder oder GeneRuler™ Low Range DNA Ladder) diente der Größenbestimmung der aufgetrennten Amplifikate oder RNAs.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte bei einer konstanten Feldstärke von 4 – 7 V/cm in 1x TAE-Laufpuffer.

Die DNA Fragmente sowie die RNAs lassen sich durch Interkalation von Ethidiumbromid auf einem UV Transilluminator mit UV Licht einer Wellenlänge von 312 nm visualisieren und per Digitalkamera dokumentieren.

Bei gelelektrophoretischer Auftrennung von RNA musste die Elektrophorese-Kammer gründlich mit Ethanol gereinigt und RNase-freie Agarose verwendet werden. Zum Ansetzen des 1x TAE-Laufpuffers wurde RNase-freies Wasser verwendet.

2.9 Statistische Auswertung

Von den ermittelten Messergebnissen der biologischen Replikate wurde der Mittelwert ermittelt. Gegebenenfalls wurde der Mittelwert des Versuchsansatzes Wildtyp-unbehandelt zu eins und die Werte für die anderen Versuchsansätze zu diesem ins Verhältnis gesetzt.

Die statistischen Analysen wurden mittels gepaartem bzw. ungepaartem t-Test durchgeführt. Die in den Diagrammen dargestellten Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Isolation und Kultivierung primärer muriner Fibroblasten des Herzens

Die Methode der Zellisolation und Zellkultivierung, wie in (Kapitel 2.2.1.1.) respektive (Kapitel 2.2.1.2.) beschrieben, wurde im Labor etabliert. Zur 75 % Subkonfluenz der Zellen nach Isolation kam es nach vier bis acht Tagen. Die Zellen stellten sich lichtmikroskopisch, wie für Zellen mesenchymalen Ursprungs beschrieben, spindelförmig dar.

Unter der Annahme der Aktivierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten durch den mechanischen Stress der Isolation wurden die Zellen dann auf Deckgläschen ausgebracht um diese anhand der Darstellung von Vimentin und *alpha smooth muscle* Aktin (α SMA) per Immunfluoreszenzfärbung zu charakterisieren. Dies ergab das Bild einer gemischten Population von aktivierten, α SMA positiven Myofibroblasten sowie ruhender, α SMA negativer Fibroblasten (Abb. 2). Gleichzeitige Anfärbbarkeit für Vimentin bestätigte den mesenchymalen Ursprung der Zellen (und diente zum Ausschluss des Vorliegens von glatten Muskelzellen (Desmin positiv, Vimentin negativ). Insgesamt bewies dies jedoch die erfolgreiche Isolation und Kultivierung primärer kardialer Fibroblasten. Jedoch musste die Menge an Myofibroblasten reduziert werden, um kontrollierte Induktionsexperimente durchführen zu können.

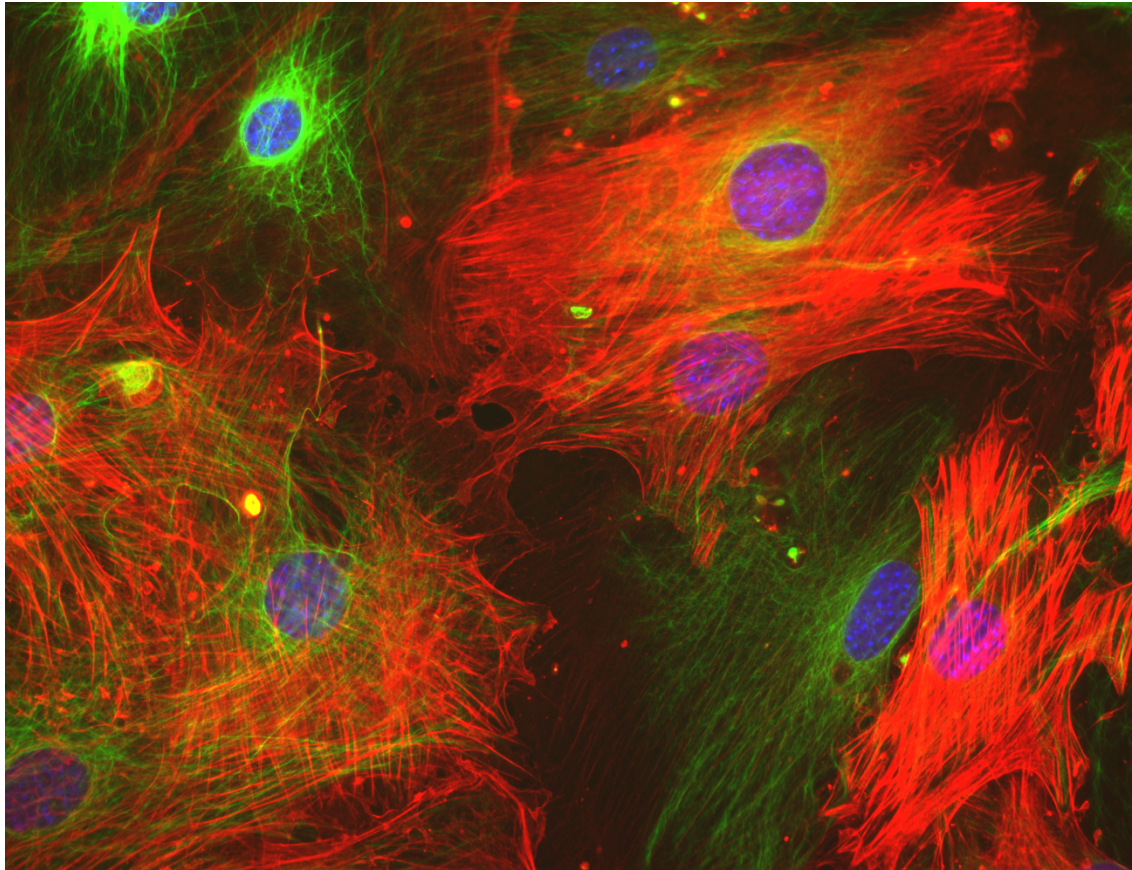


Abb. 2: Immunfluoreszenzfärbung muriner kardialer Fibroblasten nach Isolation. Primäre kardiale Mausfibroblasten wurden für 48 Stunden auf Deckgläschen kultiviert, anschließend fixiert und mit Immunfluoreszenzfarbstoff konjugierten Primärantikörpern gegen *alpha smooth muscle* Aktin (α SMA) (rot) und Vimentin (grün) gefärbt. Zellkerne (blau) sind mit DAPI gefärbt. Die Abbildung oben zeigt eine repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (40x Vergrößerung).

3.2 Serumentzug der Zellen

Daher wurde diese nach Isolation erhaltene gemischte Population in unterschiedlichen Serumbedingungen kultiviert und die Menge an α SMA negativen Vimentin positiven Zellen analysiert. Dafür wurden FCS-Konzentrationen von 10 %, 5 %, 1 % und 0,25 % und Expositionszeiten von 24 und 48 Stunden verwendet. Die resultierenden Ergebnisse wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Hierbei zeigte sich eine FCS-Konzentration von 1 % über 24 Stunden als beste Konstellation in Hinsicht auf Proliferationsrate und Verhältnis von Fibroblasten-zu-Myofibroblasten-Phänotyp. Abbildung 3 stellt den Effekt des Serumentzugs exemplarisch für FCS-Konzentrationen von 10 %, 5 % und 1 % über 24 Stunden dar.

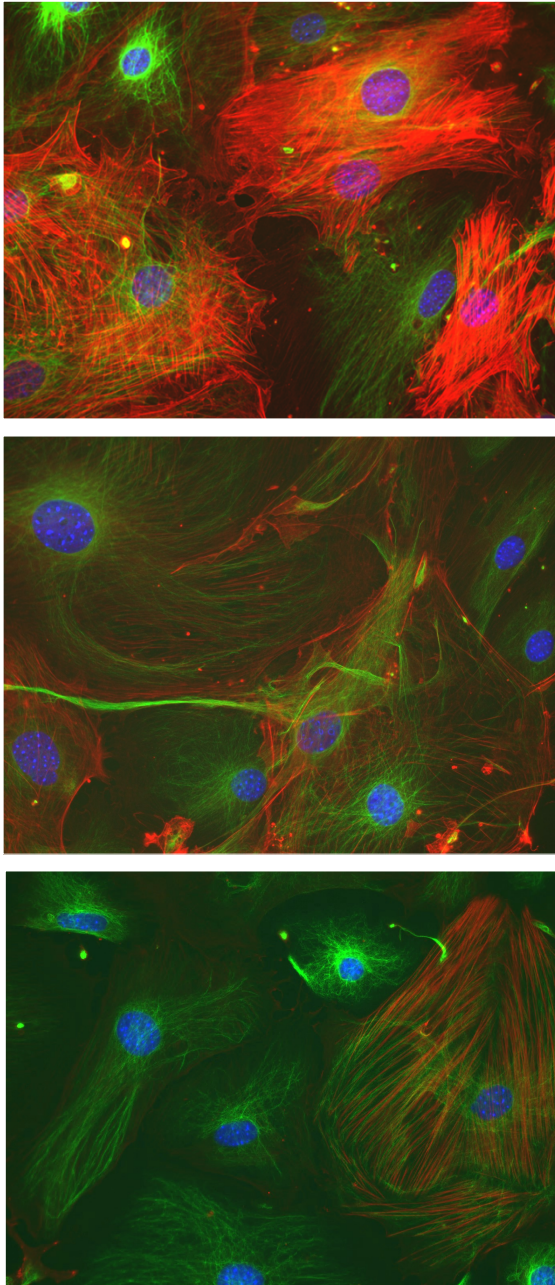


Abb. 3: Effekt des Serumentzugs auf das Verhältnis von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Primäre kardiale Mausfibroblasten wurden für 24 Stunden mit FCS-(*fetal calf serum*)-Konzentrationen von 10 % (oben), 5 % (Mitte) und 1 % (unten) kultiviert. Nach Fixierung der Zellen wurden diese mit Immunfluoreszenzfarbstoff konjugierten Primärantikörpern gegen *alpha smooth muscle Actin* (α SMA) (rot) und Vimentin (grün) gefärbt. Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Die Abbildungen zeigen repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (40x Vergrößerung).

3.3 Induktion des Myofibroblasten-Phänotyps

Um die Transdifferenzierung der Zellen vom Fibroblasten- in den Myofibroblasten-Phänotyp zu induzieren wurde dann eine Behandlung mit *Transforming Growth Factor Beta 1* (TGF- β 1) mit einer Konzentration von 2 ng/ml durchgeführt. TGF- β 1 ist in der Literatur vielfach als starker Induktor der Aktivierung vom ruhenden Fibroblasten-Phänotyp zum aktivierten Myofibroblasten-Phänotyp beschrieben worden (Kap. 1.5). Um eine suffiziente Konstellation aus Serumentzug und Induktion der Zelldifferenzierung zu finden wurden Ansätze von 24 und 48 Stunden je Teilschritt

kombiniert. Ein Serumentzug von 24 Stunden mit darauffolgender Behandlung mit TGF- β 1 für 48 Stunden zeigte in der Immunfluoreszenzfärbung die besten Ergebnisse im Hinblick auf Zellzahl und Myofibroblasten-Anteil. Abbildung 4 zeigt einen Überblick über den zeitlichen Ablauf der kontrollierten Induktion der Myofibroblasten-Differenzierung.

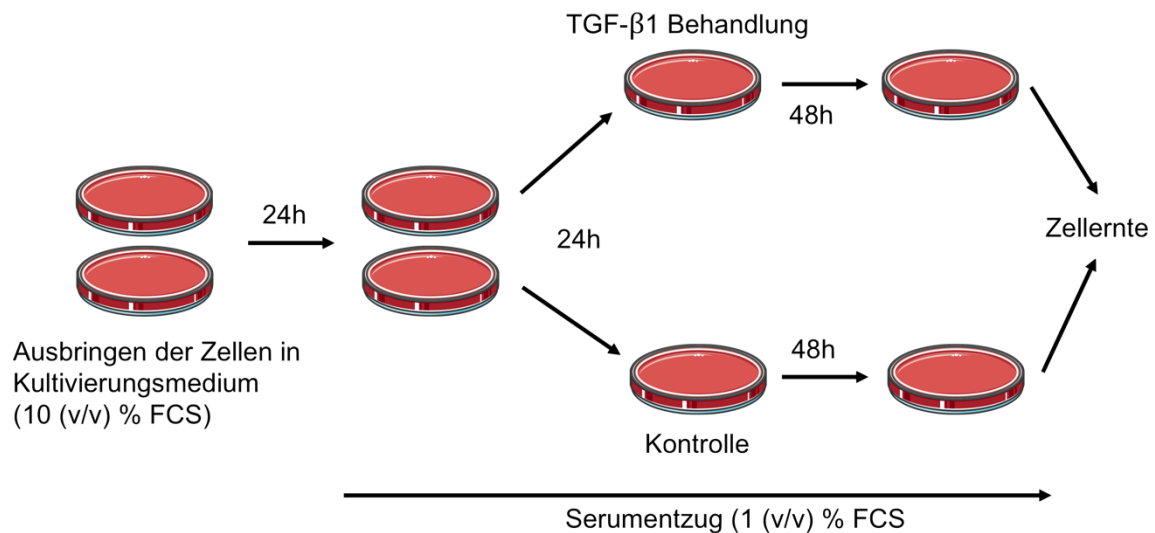


Abb. 4: Übersicht des zeitlichen Ablaufs des Serumentzugs und der TGF- β 1 Behandlung der Zellen in Kultur. Nach Kultivierung für 24 Stunden in 1 % FCS im Medium. Hiernach wurden die Zellen für 48 Stunden mit 2 ng/ml TGF- β 1 und die Kontrollen mit einem äquivalenten Volumen des TGF- β 1 Lösungsmittels behandelt. Nach insgesamt 96 Stunden wurden die Zellen für weitere Analysen geerntet bzw. fixiert.

3.4 Der Einfluss von TERT auf die Myofibroblasten-Differenzierung

Um nun den Einfluss von mitochondrialer TERT, aber auch von TERT generell, auf die Kapazität von Fibroblasten in Myofibroblasten zu differenzieren, zu untersuchen, wurden kardinale Fibroblasten aus Herzen von TERT Wildtyp, TERT-defizienten und mitoTERT Mäusen isoliert. Danach wurden die Zellen wie in Abbildung 4 kultiviert und die Myofibroblastendifferenzierung induziert.

Die Expression von α SMA wurde dann sowohl durch Auswertung von Immunfluoreszenzfärbungen als auch semiquantitativem Nachweis der Proteinmenge im Western-Blot bestimmt.

3.4.1 Immunfluoreszenzfärbung

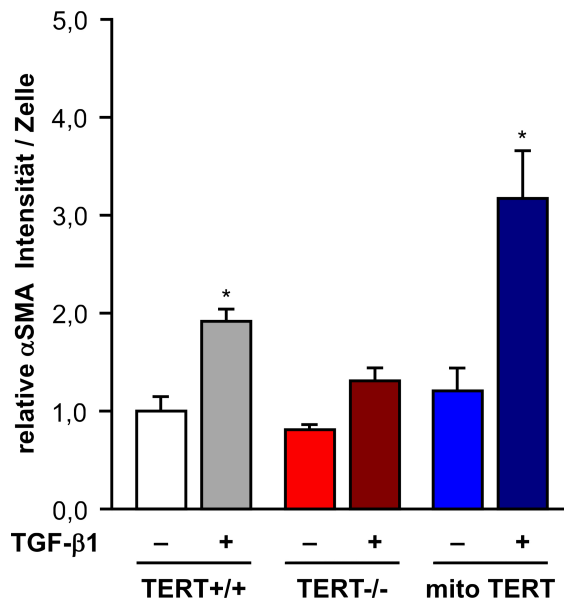


Abb. 5: Effekt von TERT auf die Myofibroblastendifferenzierung. Primäre kardiale Fibroblasten wurden kultiviert und behandelt wie etabliert. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden diese mit direkt gekoppelten Antikörpern gegen *alpha smooth muscle* Aktin (α SMA, rot) und Vimentin (grün) gefärbt. Anschließend erfolgten fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Die gemessenen Signalintensitätswerte wurden ins Verhältnis der in den Bildaufnahmen ausgezählten Zellkerne gesetzt. Gezeigt ist die relative α SMA Signalintensität pro Zelle mit (+) und ohne (-) TGF- β 1 Behandlung. Der Mittelwert für den unbehandelten Wildtyp (TERT+/+) wurde zu eins gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte über einen Student's T-Test (zweiseitig, ungepaart, n=6, *p<0,05 vs. unbehandelt selber Genotyp,) Mittelwert \pm SEM).

Die quantitative Auswertung des α SMA-Signals in den Immunfluoreszenzfärbungen zeigte, dass die Behandlung mit TGF- β 1 in TERT-/- Zellen nur einen ca. 1,5 fachen Anstieg zeigte, wohingegen sowohl in Wildtyp als auch in mitoTERT Zellen der Anstieg 2 fach bis 2,5 fach war (Abbildung 5). Die statistische Auswertung der Behandlung zum jeweiligen unbehandelten Genotyp zeigte für alle drei Genotypen eine signifikante Erhöhung.

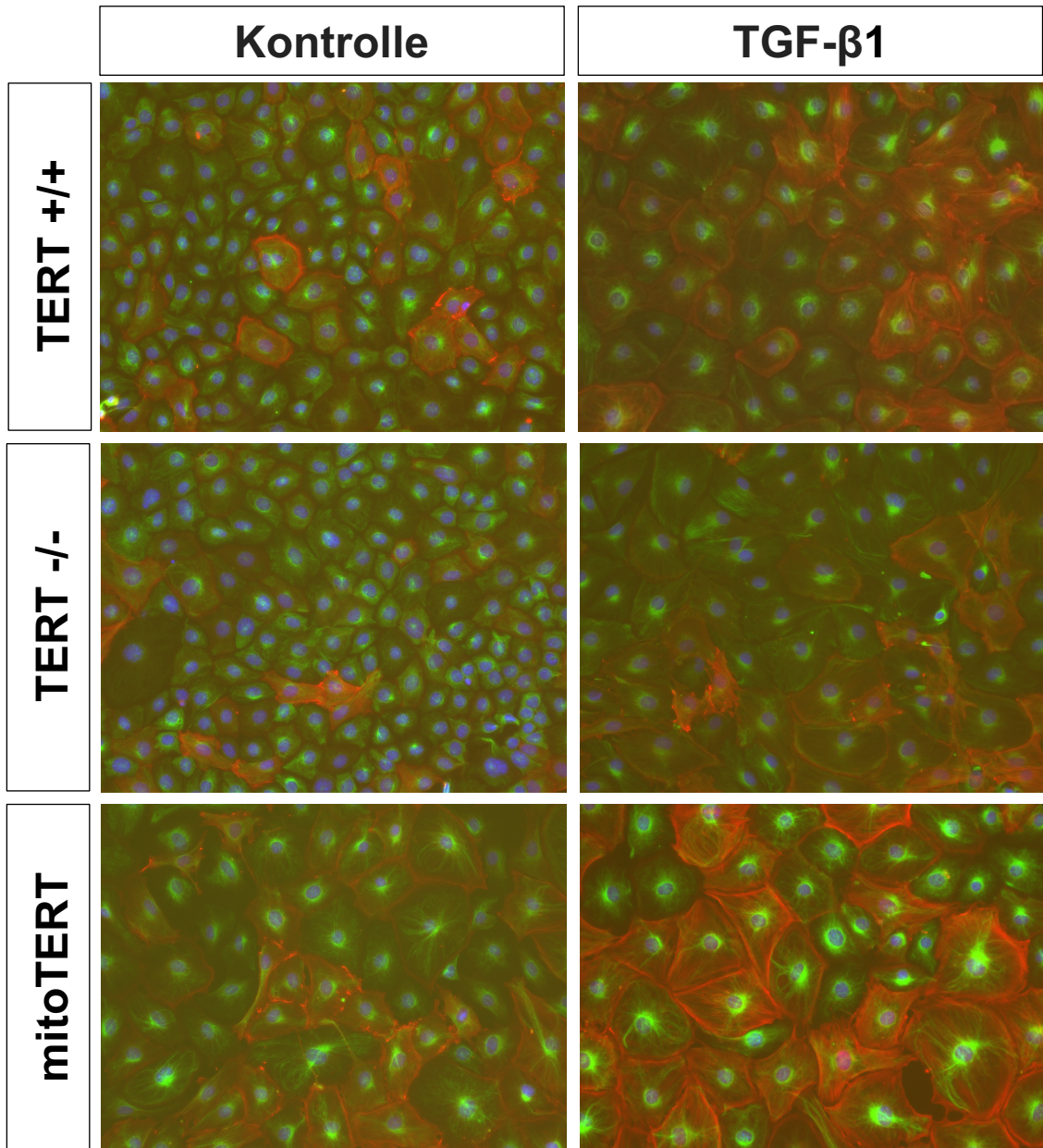


Abb. 6: Rolle von TERT bei der Myofibroblastendifferenzierung. Primäre kardiale Fibroblasten wurden kultiviert und behandelt wie etabliert. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden diese mit direkt gekoppelten Antikörpern gegen *alpha smooth muscle* Aktin (α SMA, rot) und Vimentin (grün) gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Anschließend erfolgten fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen der untersuchten Genotypen (Wildtyp (TERT (+/+), TERT defizient (TERT (-/-)) und mitoTERT).

Entsprechend der erhobenen Daten zeigten die repräsentativen Immunfärbungen die erwartete Änderung der Zellmorphologie, die in TERT^{-/-} Zellen am wenigsten ausgeprägt war (Abbildung 6).

Die Daten, die mittels Immunfärbung erhoben wurden, sollten dann proteinbiochemisch bestätigt werden.

3.4.2 Proteinbiochemische Auswertung

Die semiquantitative Analyse der relativen α SMA Proteinmengen zeigte, dass es in kardialen Fibroblasten aus TERT^{-/-} Herzen durch TGF- β 1 nicht zu einem Anstieg der α SMA Proteinmenge kam. Im Gegensatz dazu zeigten Wildtyp und mitoTERT einen signifikanten Anstieg um das 1,8- bis 2,3-fache (Abbildung 7).

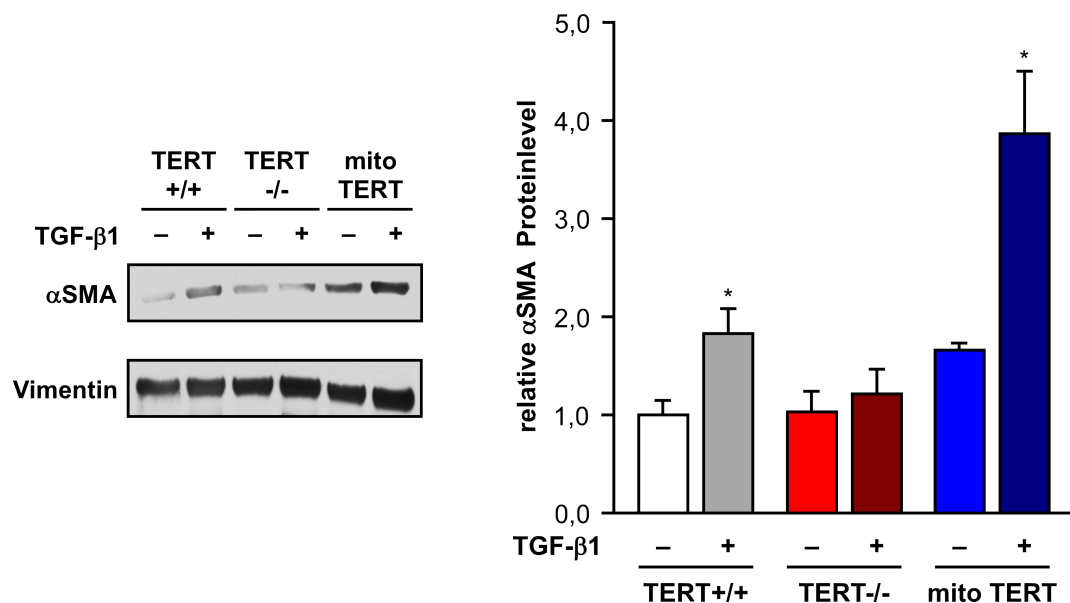


Abb. 7: Effekt von TERT auf die Myofibroblastendifferenzierung. Primäre kardiale Fibroblasten wurden kultiviert und behandelt wie etabliert. Die linke Seite der Abbildung zeigt einen repräsentativen Westernblot. Oben α SMA, unten Vimentin. Vimentin diente als Gleichladungskontrolle. Das Balkendiagramm zeigt die relativen α SMA Proteinlevel mit (+) und ohne (-) TGF- β 1 Behandlung. Der Mittelwert für den unbehandelten Wildtyp (TERT+/+) wurde zu eins gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte über einen Student's T-Test (zweiseitig, ungepaart, n=5, *p<0,05 vs. nicht behandelte selber Genotyp, Mittelwert \pm SEM).

Zusammengenommen weisen diese Daten darauf hin, dass TERT eine wesentliche Rolle bei der Myofibroblastendifferenzierung durch TGF- β 1 spielt. Weiterhin zeigen diese Ergebnisse, dass mitochondriale TERT anscheinend ausreicht, um die Differenzierung durch TGF- β 1 zu induzieren.

3.5 Rolle von TERT bei der TGF- β 1-induzierten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Es ist bekannt, dass die Signaltransduktion über den TGF-Rezeptor zu einer Erhöhung der intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt [106]. Zudem wurde nachgewiesen, dass eine Reduktion von TERT mit erhöhten ROS einhergeht [100]. Daher wurde der Effekt von TERT auf die durch TGF- β 1-induzierte ROS Bildung näher untersucht. Dies wurde unter Anwendung des fluoreszierenden Farbstoffs H₂-DCF-DA (2,7-Dichlordihydrofluoresceindiacetat) durchflusszytometrisch gemessen. Dabei wurde wie zuvor das etablierte Modell für die Myofibroblastendifferenzierung eingesetzt. Es zeigte sich, wie zuvor publiziert, dass TERT ^{-/-} Zellen bereits unter basalen Bedingungen bis zu 3-fach erhöhte ROS aufwiesen. Diese ROS führten aber nicht zu einer Ausbildung des Myofibroblastenphänotyps unter basalen Bedingungen, wie aus den Abbildungen 4-6 ersichtlich wird. Zudem war eine Stimulation mit TGF- β 1 nicht in der Lage die ROS Bildung in TERT ^{-/-} zu steigern. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit TGF- β 1 in Wildtyp und mitoTERT Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der ROS Spiegel um das 1,8-fache bzw. 2,6-fache im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. (Abbildung 8).

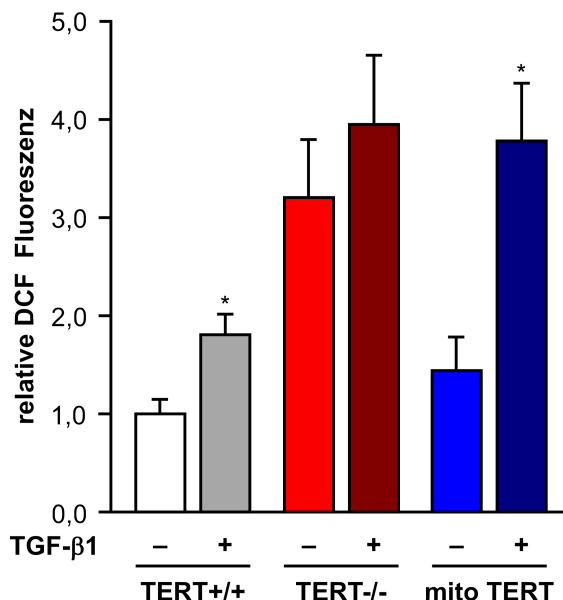


Abb. 8: Effekt von TERT auf die durch TGF- β 1-induzierte ROS Bildung. Primäre kardiale Fibroblasten wurden kultiviert und behandelt wie etabliert. Die durchflusszytometrische Messung intrazellulärer ROS erfolgte unter Anwendung des fluoreszierenden Farbstoffs H₂-DCF-DA (2,7-Dichlordihydrofluoresceindiacetat). Gezeigt ist die relative DCF Fluoreszenz mit (+) und ohne (-) TGF- β 1 Behandlung. Der Mittelwert für den unbehandelten Wildtyp (TERT+/+) wurde zu eins gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte über einen Student's T-Test (zweiseitig, ungepaart, n=7, *p<0,05 vs. nicht behandelte selber Genotyp, Mittelwert \pm SEM).

3.6 Einfluss von TERT auf die Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP2) RNA Menge

Wie in der Literatur beschrieben sezernieren Myofibroblasten Matrix-Metalloproteinasen welche die Extrazellulärmatrix abbauen und dadurch zur Freisetzung und Bindung von TGF- β 1 führen (siehe Einleitung).

Um diesen Mechanismus in den vorliegenden Zellen zu bestätigen wurden die relativen Level des MMP2 Transkripts bestimmt. Hierzu wurde RNA isoliert, DNase verdaut und nach reverser Transkription in einer semiquantitativen Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) mit MMP2-spezifischen Primern untersucht (Abbildung 9).

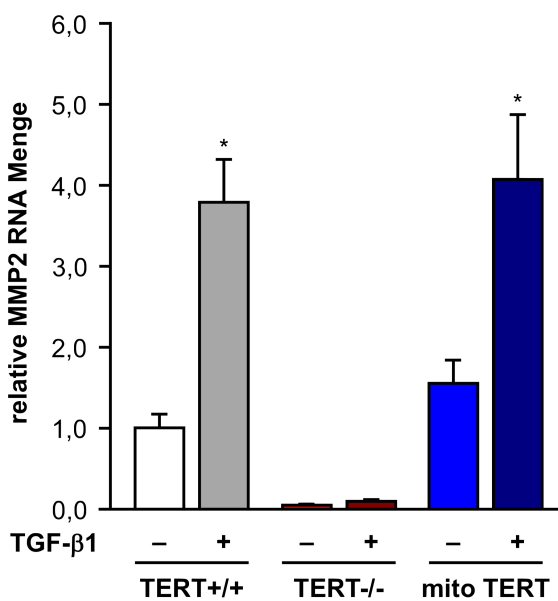


Abb. 9: Einfluss von TERT auf die Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP2) RNA Menge in kardialen Fibroblasten. Primäre kardiale Fibroblasten wurden wie etabliert kultiviert und mit TGF- β 1 behandelt. Die relative Menge an MMP2 RNA wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Gezeigt ist die relative Menge MMP2 RNA mit (+) und ohne (-) TGF- β 1 Behandlung. Der Mittelwert für den unbehandelten Wildtyp (TERT+/+) wurde zu eins gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte über einen Student's T-Test. (zweiseitig, ungepaart) (n=5, *p<0,05 vs. TERT -/-, Mittelwert \pm SEM).

Es zeigte sich, dass das MMP2 Transkript in den TERT (-/-) defizienten Zellen im Vergleich zu Wildtyp und mitoTERT Zellen wesentlich geringer exprimiert ist.

Dies traf sowohl auf die unbehandelten als auch auf die mit TGF- β 1 behandelten Zellen zu. Daraus könnte man ableiten, dass in TERT-defizienten Zellen der Umbau der Extrazellulärmatrix nur eingeschränkt möglich ist.

3.7 Einfluss von TERT auf die NOTCH-1 RNA Menge

NOTCH-1 ist ein Transmembranrezeptor aus der Notch Familie, die in Säugern aus 4 Mitgliedern besteht. Nach Aktivierung durch membranständige Liganden auf benachbarten Zellen werden die Notch-Proteine gespalten, worauf die *notch intracellular*

domain (NICD) in den Zellkern translozieren kann und dort die Expression von Notch-

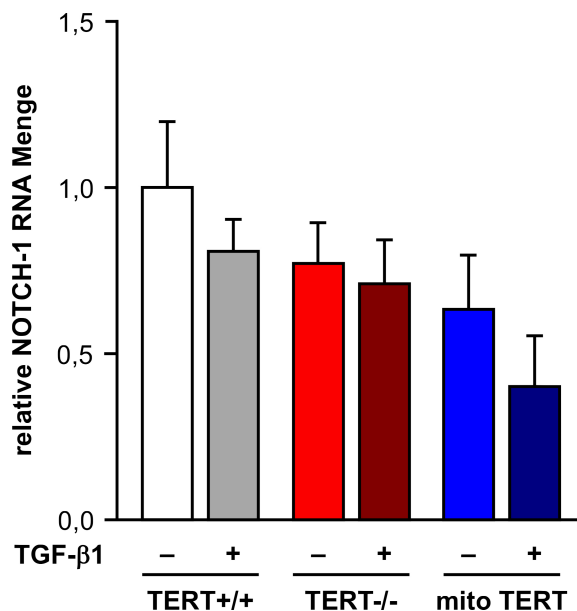


Abb. 10: Einfluss von TERT auf die NOTCH-1 RNA Menge in kardialen Fibroblasten. Primäre kardiale Fibroblasten wurden wie etabliert kultiviert und mit TGF-β1 behandelt. Die relative Menge an NOTCH-1 RNA wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Gezeigt ist die relative Menge NOTCH-1 RNA mit (+) und ohne (-) TGF-β1 Behandlung. Der Mittelwert für den unbehandelten Wildtyp (TERT+/+) wurde zu eins gesetzt. Die Auswertung erfolgte über einen Student's T-Test. (n=5, Mittelwert ± SEM).

Zielgenen reguliert. Die Notch-Signaltransduktion scheint der Fibroseentstehung durch Inhibition der Myofibroblastendifferenzierung entgegenzuwirken [107]. Zudem kommt es in Fibroblasten aus neonatalen Rattenherzen nach TGF-β1-Behandlung zur Herunterregulation von NOTCH-1 auf der Transkriptebene [108]. Daher war es von Interesse, die Expression von NOTCH-1 in den kardialen Fibroblasten aus den adulten Mäusen im Kontext der Myofibroblastendifferenzierung zu untersuchen. Hierzu wurde die relative NOTCH-1 RNA Menge in den Zellen wie für MMP2 beschrieben untersucht (Abbildung 10).

Es zeigten sich keine Unterschiede in der relativen Menge des NOTCH-1 Transkripts sowohl zwischen den unbehandelten Fibroblasten aus den unterschiedlichen Genotypen, als auch nach TGF-β1-Behandlung.

3.8 Einfluss von TERT auf die Thioredoxin-1 RNA Menge

Nachdem sich gezeigt hatte, dass es nach TGF-β1 Behandlung nur in den kardialen Fibroblasten aus TERT+/+ und mitoTERT Tieren, nicht aber in denen aus TERT-defizienten Mäusen zu einer Erhöhung der ROS-Menge kommt, wurde die Veränderung des anti-oxidativen Proteins Thioredoxin-1 untersucht. Hierzu wurde zunächst die relative Transkriptmenge in den 3 Zelltypen analog zu MMP2 und NOTCH-1 bestimmt (Abbildung 11).

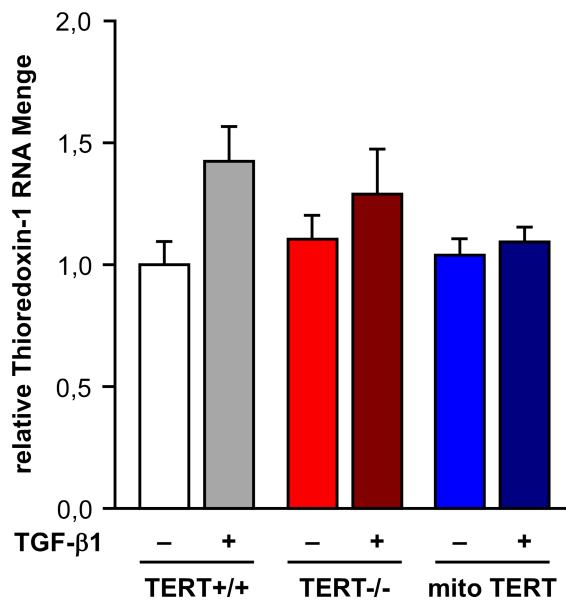


Abb. 11: Einfluss von TERT auf die Thioredoxin-1 RNA Menge in kardialen Fibroblasten. Primäre kardiale Fibroblasten wurden wie etabliert kultiviert und mit TGF-β1 behandelt. Die relative Menge an Thioredoxin-1 RNA wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Gezeigt ist die relative Menge Thioredoxin-1 RNA mit (+) und ohne (-) TGF-β1 Behandlung. Der Mittelwert für den unbehandelten Wildtyp (TERT+/+) wurde zu eins gesetzt. Die Auswertung erfolgte über einen Student's T-Test. (n=5, Mittelwert ± SEM).

Es zeigte sich keine signifikante Änderung der Thioredoxin-1 Transkriptmenge nach TGF-β1 Behandlung im Vergleich zu den Kontrollen. Auch zwischen den drei Genotypen ließen sich sowohl ohne als auch mit Behandlung mit TGF-β1 keine signifikanten Unterschiede nachweisen.

3.9 Einfluss von TERT auf die Thioredoxin-1 Proteinmenge

Wie in der Einleitung beschrieben, kommt es durch erhöhten oxidativen Stress zu einer Degradation von Thioredoxin-1 Protein und nicht zu einer Reduktion auf RNA Ebene. Nachdem auf RNA Ebene keine Unterschiede in der Thioredoxin-1 Expression nachzuweisen waren, wurden nun die Proteinmengen von Thioredoxin-1 untersucht. Nachdem durch TGF-β1 nur in kardialen Fibroblasten aus Wildtyp und mitoTERT Tieren eine ROS Bildung induziert werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass nur in diesen Zellen es zu Veränderungen in der Thioredoxin-1 Proteinmenge kommen würde.

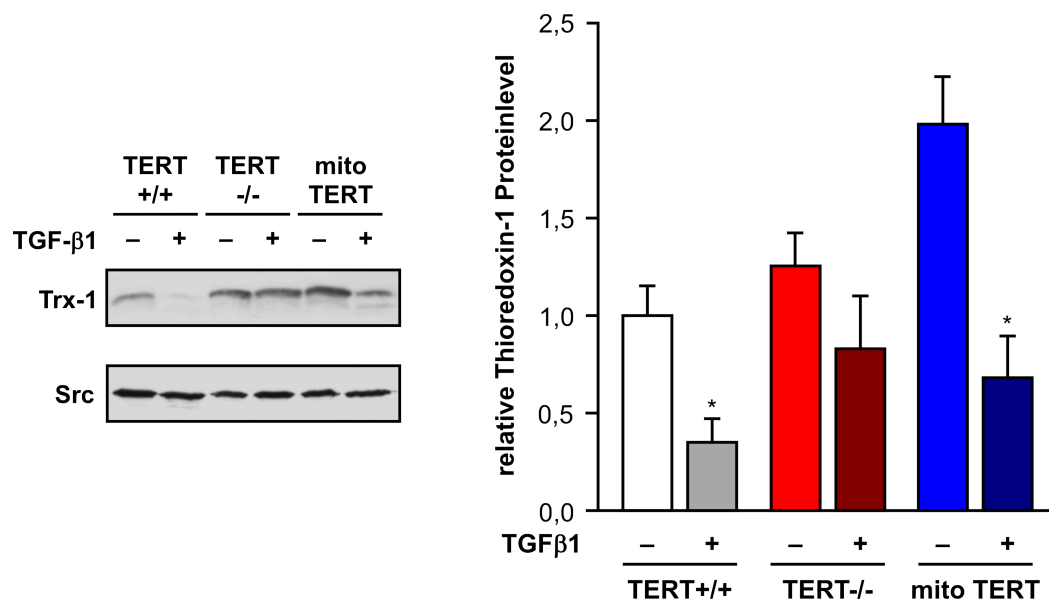


Abb. 12: Einfluss von TERT auf die Thioredoxin-1 Proteinmenge. Primäre kardiale Fibroblasten wurden kultiviert und behandelt wie etabliert. Die linke Seite der Abbildung zeigt einen repräsentativen Westernblot. Oben α SMA, unten Src. Src diente als Gleichladungskontrolle. Das Balkendiagramm zeigt die relativen Thioredoxin-1 Proteinlevel mit (+) und ohne (-) TGF- β 1 Behandlung. Der Mittelwert für den unbehandelten Wildtyp (TERT+/+) wurde zu eins gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte über einen Student's T-Test (zweiseitig, ungepaart, n=5, *p<0,05 vs. nicht behandelte selber Genotyp, Mittelwert \pm SEM).

Wie Abbildung 12 zeigt, wurde tatsächlich eine signifikante Reduktion der Thioredoxin-1 Proteinmengen in Wildtyp und mitoTERT Zellen nachgewiesen. Hingegen kam es nicht zu einer Veränderung in TERT-/- Zellen (Abbildung 12). Da Thioredoxin-1 in Endothelzellen mit Aktin assoziiert ist und dadurch die Ausbildung von dicken Aktinfasern verhindert [50], könnten diese Ergebnisse darauf hindeuten, dass die Thioredoxin-1 Degradation notwendig ist für die Myofibroblastendifferenzierung, da dabei eine Restrukturierung von Aktinfasern notwendig ist. Um diese Vermutung zu bestätigen müssen aber noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

4 Diskussion

Grundlage der Untersuchung der Rolle von Thioredoxin-1 und TERT für die Differenzierung von kardialen Fibroblasten zu Myofibroblasten (im Folgenden Myofibroblastendifferenzierung) ist die Etablierung einer Zellkultur mit überwiegendem Fibroblastenphänotyp sowie der optimalen experimentellen Bedingungen der Myofibroblasteninduktion. Daher wurde nach erfolgreicher Etablierung der Zellisolationmethode eine fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der vorliegenden Fibroblastenphänotypen durchgeführt. Der zur Identifikation verwendete Marker α SMA ist ein etablierter Marker für den Myofibroblastenphänotyp [109].

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigten das Bild einer gemischten Population von Fibroblasten und Myofibroblasten (siehe Kap. 3). Übereinstimmend mit der verfügbaren Literatur lässt sich schließen, dass die ruhenden Fibroblasten durch den mechanischen Stress [110] der Isolation und die Kultivierung auf rigidem Plastikmaterial ([111-114]) zu Myofibroblasten aktiviert wurden. Um die Differenzierung vom Fibroblasten- zum Myofibroblastenphänotyp untersuchen zu können, mussten Kultivierungsbedingungen etabliert werden, die zu ca. 90 % einen Fibroblastenphänotyp aufwiesen. Dies gelang durch Reduktion der Serumkonzentration im Kultivierungsmedium auf 1 (v/v) % über einen Zeitraum von 24 Stunden. Geprüft wurde die erfolgreiche Kultivierung durch Nachweis des Überwiegens von α SMA negativen und Vimentin positiven Zellen per Immunfluoreszenzmikroskopie (Abb. 3).

Die genauen Zeitintervalle die notwendig sind um kardiale Myofibroblasten zu Fibroblasten zu differenzieren und die anschließende Dauer der TGF- β 1 Behandlung unterliegen einer Vielzahl von Faktoren wie beispielsweise Tierart, Isolationmethode, Kultivierungsmethode(-bedingungen) und Zellpassage. Diese Zeitintervalle wurden daher für die hier untersuchten Zellen empirisch ermittelt (siehe Kap. 3.2).

Bis heute gibt es keinen allgemein akzeptierten Standard für Isolation, Kultivierung und Induktion des Myofibroblastenphänotyps. Für die Isolation kardialer Fibroblasten stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Eine aktuelle Studie von Zhou et.al. zeigt die Bedeutung unterschiedlicher Isolutions- und Kultivierungsmethoden auf [115]. Die in dieser Arbeit etablierte Methode der Isolation und Kultivierung kardialer Fibroblasten ist im Hinblick auf die Fragestellung sowohl zeit- als auch kosteneffektiv. Zhou et. al. konnten in ihrer Arbeit darstellen, dass ein Kollagenaseverdau mit nachfolgend direkter

Ausplattierung und konsekutivem Passagieren der Zellen auch im Vergleich zur Nutzung kommerziell erhältlicher Isolationskits mit zelldurchlusszytometrischer Sortierung verlässliche Ergebnisse zeigt. Konträr zu den von Zhou et. al. berichteten Ergebnissen ermöglicht die in dieser Arbeit etablierte Methode jedoch stabile Proliferationsraten und Differenzierungskapazitäten auch nach Passagieren der kardialen Fibroblasten.

Neben der Bestimmung der α SMA Proteinmenge mittels Immunfluoreszenz wurde auch die Methode des Westernblots durchgeführt. Hier sollte angemerkt werden, dass die Immunfluoreszenz den Vorteil bietet, die Konformation des α SMA in organisierten Fasern zu beurteilen. Dies ist notwendig da theoretisch die Möglichkeit besteht, dass die Erhöhung der Signalintensität für α SMA durch den Nachweis von α SMA-Monomeren zustande kommt. Für die Funktion der Myofibroblasten sind jedoch organisierte α SMA-Fasern charakteristisch. Sowohl in Abb. 2 als auch Abb. 3 und Abb. 6 lassen sich diese Fasern erkennen. Die Ergebnisse beider Methoden waren miteinander vergleichbar. Es zeigte sich für Wildtyp- und mitoTERT-Zellen jeweils eine signifikante Erhöhung der α SMA Mengen, nicht aber für die TERT-defizienten Zellen. Daher zeigen diese Daten, dass die Abwesenheit von TERT die Differenzierung zum Myofibroblasten durch TGF- β 1 einschränkt. Einen wesentlichen Beitrag zur Induktion von α SMA durch TGF- β 1 leistet der Anstieg von intrazellulären Spiegeln reaktiver Sauerstoffspezies. So konnten Cucoranu et. al. zeigen, dass durch den Einsatz einer NADPH Oxidase 4 (NOX4)-spezifischen siRNA die TGF- β 1 abhängige Expression von α SMA von NOX4 abhängig ist [33]. Ergänzend konnten Chan et.al. in kardialen Mausfibroblasten nachweisen, dass die TGF- β 1 abhängige Myofibroblastendifferenzierung, gemessen anhand der Kollagen-Transkript Menge, von einer NOX4 induzierten ROS Level Erhöhung abhängt [116]. Ein weiterer Mechanismus durch den ROS die Myofibroblastendifferenzierung verstärken ist die Konversion des inaktiven TGF- β 1 -Komplexes in die biologisch aktive Form [117]. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass durch TGF- β 1 keine ROS Erhöhung in TERT (-/-) defizienten Mausfibroblasten nachweisbar war. Jedoch waren die ROS Spiegel in den unbehandelten TERT (-/-) Kontrollen bereits erhöht, verglichen mit Wildtyp- und mitoTERT Kontrollzellen. Eine Reduktion von TERT durch siRNAs und shRNAs führte auch in Hautfibroblasten und in humanen Endothelzellen zu einer Erhöhung der intrazellulären ROS Spiegel [100, 118]. Es könnte also sein, dass die bereits erhöhten intrazellulären ROS Spiegel in den TERT-defizienten kardialen

Fibroblasten eine durch TGF- β 1 induzierte Steigerung der ROS verhindern. Zumindest konnte keine Steigerung der ROS nachgewiesen werden und demzufolge auch keine Differenzierung in Myofibroblasten.

Wie in der Einleitung dargestellt ist die Expression von α SMA-Fasern, neben ihrer Syntheseleistung, eine funktionell entscheidende Eigenschaft für die Funktionsfähigkeit kardialer Myofibroblasten. Im Kontext der kardialen Myofibroblastendifferenzierung könnte Thioredoxin-1 wichtige Funktionen haben. So konnten Zschauer et.al. in Endothelzellen eine direkte Interaktion von Thioredoxin-1 mit Aktin zeigen. Diese Bindung verhindert die H₂O₂-induzierte Bildung von Stressfasern [50]. Auch in kardialen Fibroblasten könnte die Faser Bildung von α SMA von der Proteinmenge von Trx-1 abhängig sein. Zudem ist beschrieben worden, dass Trx-1 unter erhöhten ROS Spiegeln abgebaut wird [47, 119]. So könnte auch die TGF- β 1 induzierte Erhöhung der ROS Level zu einem Verlust von Trx-1 führen und so die Polymerisierung der Aktin-Monomere steigern. In Endothelzellen war die Thioredoxin-1 Reduktion auf Protein- und nicht auf Transkriptionsebene reguliert [50]. Dieselbe Regulationsebene konnte auch in den hier untersuchten kardialen Fibroblasten gezeigt werden. So zeigt sich eine TGF- β 1 abhängige Reduktion der Thioredoxin-1 Proteinlevel, nicht aber der Thioredoxin-1 RNA Transkriptmengen (Abb. 11 und Abb. 12).

Für die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten sind noch weitere Marker - neben dem für die Erkennung von Myofibroblasten meist eingesetzten α SMA [71, 120] - verantwortlich. Ein weiterer potenzieller Marker ist die Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP2) [121, 122], die auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde.

MMP2 wird im Rahmen eines I/R-Schadens im Myofibroblasten exprimiert [123, 124]. Es dient dem Myofibroblasten zum Abbau der Extrazellulärmatrix. MMP2 kann über den Abbau des Proteoglykans Decorin das Zytokin TGF- β 1 aus der Extrazellulärmatrix herauslösen [125]. Die Freigabe und Bindung von TGF- β 1 aus der Extrazellulärmatrix könnte ein Verstärkermechanismus migrierender Myofibroblasten sein. Zudem konnten Siwak et. al. zeigen, dass eine Behandlung mit H₂O₂ oder einem Superoxid-Dismutase Inhibitor zu einer signifikanten Erhöhung der MMP2 Aktivität führte [126]. In der vorliegenden Arbeit zeigten die TERT defizienten Zellen ein signifikant niedrigeres MMP2 Transkriptlevel als die Wildtyp- und mitoTERT Zellen, welches auch kaum

durch TGF- β 1 gesteigert werden konnte. MMP2 defizienten Mäuse hatten nach dauerhaftem Verschluss der linken Herzkranzarterie eine bessere Überlebensrate als Wildtyp Kontrollmäuse [127]. Dies wurde auf die verminderte Rate an Herzwandrupturen und das verminderte negative linksventrikuläre Remodelling zurückgeführt. In Anbetracht dieser Ergebnisse aus Arbeiten mit MMP2 defizienten Mäusen könnte dieser Aspekt im Rahmen eines Myokardinfarkts vorteilhaft sein. Da die signifikant verminderte MMP2 Transkription der TERT (-/-) Fibroblasten jedoch mit einer gestörten Myofibroblastendifferenzierung einhergeht lässt sich mutmaßen, dass der Vorteil in diesen Mäusen nicht mit der Defizienz von MMP2 im Fibroblasten zusammenhängt, sondern in anderen Zellen, da es sich hier um einen vollständigen knock out handelt. Denn eine fehlende Aktivierung kardialer Fibroblasten zu Myofibroblasten könnte zu einer verminderten Narbenbildung in der Infarktzone führen. Dies könnte wiederum zu linksventrikulärer Dilatation mit konsekutiver Abnahme der Herzleistung oder linksventrikulärer Wandruptur führen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Trx-1 und TERT sowie der Lokalisation von TERT und der Fähigkeit von kardialen Fibroblasten zu Myofibroblasten zu differenzieren (Abb. 13). So ist es wesentlich, dass es zu einem Abbau von Trx-1 in kardialen Fibroblasten kommt. Das Fehlen von TERT ist mit einer, im Vergleich zum Wildtyp, verringerten Myofibroblastendifferenzierungsfähigkeit assoziiert. Übereinstimmend hiermit konnten Liu et. al. in einem Mausmodell zur Bleomycin-induzierten Lungenfibrose demonstrieren, dass TERT defiziente Lungenfibroblasten eine erniedrigte Myofibroblastendifferenzierung aufweisen. Dies war assoziiert mit einem geringeren Ausmaß an fibrosiertem Lungengewebe [128].

Im Kontrast zum vollständigen Fehlen von TERT führte spezifisch mitochondriales TERT zu einer, im Vergleich zum Wildtyp, verbesserten Myofibroblastendifferenzierungsfähigkeit. Dies konnte so bisher nicht gezeigt werden. Hierfür gibt es in der verfügbaren Literatur Daten die Erklärungsansätze bieten. So ist bekannt, dass der zelluläre Vorgang der Differenzierung kardialer Fibroblasten zu Myofibroblasten mit einem erhöhten mitochondrialen Sauerstoffverbrauch und erhöhtem mitochondrialem Inhalt einhergeht [74]. Es konnte gezeigt werden, dass die mitochondrial lokalisierte TERT zu einer Aktivitätssteigerung der

Atmungskettenkomplexe, Abnahme der mitochondrialen ROS Produktion und zum Schutz vor ROS-induzierter Apoptose führt [100, 118, 129, 130]. Nicht publizierte Daten aus dem Labor von Frau Prof. Haendeler konnten in Herzgewebe von mitoTERT Mäusen eine erhöhte Atmungskettenaktivität nachweisen. Weiterhin zeigten unveröffentlichte Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe Haendeler in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Gödecke, dass 2 Tage nach Ischämie und Reperfusion die TERT-defizienten Mäusen im Vergleich zu TERT Wildtyp und mitoTERT Mäusen den größten Infarkt aufwiesen. Inwieweit die in dieser Arbeit untersuchten kardialen Fibroblasten zu diesem Effekt beitragen ist noch ungeklärt. Jedoch, wie bereits in (Kap. 1) beschrieben, sind es die kardialen Fibroblasten die im Zusammenspiel mit Zellen des Immunsystems das kardiale Remodelling nach einem I/R-Schaden entscheidend prägen.

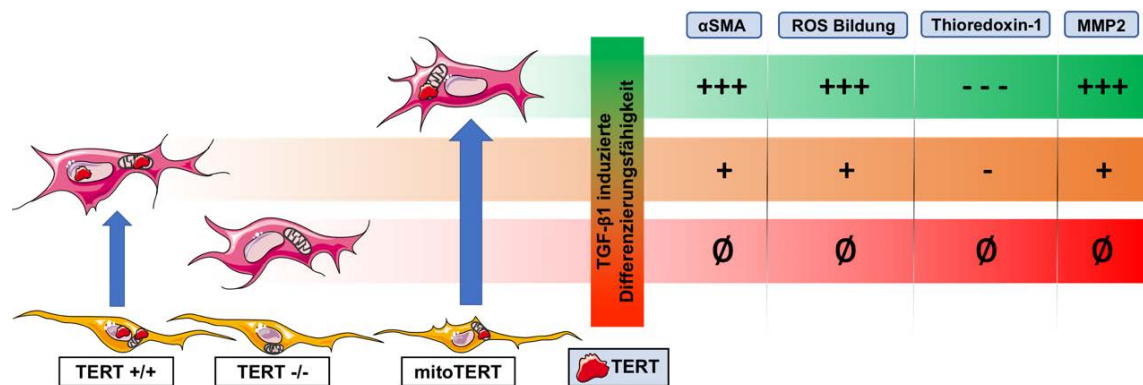


Abb.13: Zusammenfassung der Ergebnisse. Die Fähigkeit der hier untersuchten kardialen Fibroblasten TGF-β1 abhängig zu Myofibroblasten zu differenzieren, zeigt eine Abhängigkeit vom Vorhandensein bzw. der Lokalisation von TERT und der Reduktion der Thioredoxin-1 Proteinmenge. In TERT defizienten kardialen Fibroblasten ist die Myofibroblastendifferenzierung, gemessen am Anstieg der αSMA Konzentration, gestört. TERT defiziente Zellen zeigen außerdem keine TGF-β1 abhängige ROS Erhöhung und Trx-1 Abnahme. Das Transkriptionslevel der Matrix-Metalloproteinase 2 ist im Vergleich zum Wildtyp und mitoTERT signifikant erniedrigt. Im Kontrast dazu führt die exklusive Lokalisation von TERT im Mitochondrium (mitoTERT) zu den entgegengesetzten Effekten, also einer über den Wildtyp verbesserten Fähigkeit zur Myofibroblastendifferenzierung. So war die TGF-β1 induzierte Bildung von αSMA-Stressfasern assoziiert mit einer Abnahme von Thioredoxin-1.

4.1 Ausblick

Aus den vorliegenden Ergebnissen für die Myofibroblastendifferenzierung von TERT defizienten kardialen Fibroblasten ergibt sich weiterer Forschungsbedarf. So ist von Interesse ob die Fähigkeit der Myofibroblastendifferenzierung dieses Genotyps durch

Behandlung mit reaktiven Sauerstoffspezies (bspw. H_2O_2) bzw. *knockdown* von Thioredoxin-1 verbessert werden kann.

Für den mitoTERT Genotyp ergibt sich die Frage der physiologischen Relevanz der erhobenen Daten. So sind weitere Untersuchungen dieses Genotyps im Tiermodell von Interesse. Hierbei insbesondere der Einfluss von mitoTERT auf das kardiale Remodelling nach Myokardinfarkt bzw. Setzen eines Ischämie/Reperfusionsschadens. Des Weiteren könnte man untersuchen, welchen Einfluss mitoTERT auf die interstitielle kardiale Fibrose im Rahmen der Herzinsuffizienz hat.

TA-65 ist ein kommerziell erhältlicher Telomerase-Aktivator [108]. Randomisierte kontrollierte Studien zum Einfluss von TA-65 sowohl auf Primär- und Sekundärprävention als auch Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen fehlen jedoch noch. Im Kontext der hier besprochenen Daten wäre es von Interesse den Einfluss von TA-65 auf mitochondriales TERT zu untersuchen. So stellt sich die Frage ob TA-65 in Wildtyp Zellen ähnliche Effekte bewirken kann wie sie in den hier untersuchten mitoTERT Zellen gefunden wurden.

4.2 Schlussfolgerung

Aus den besprochenen Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich schließen, dass mitochondrial lokalisiertes TERT und die Abnahme von Thioredoxin-1 Protein wichtige Faktoren für die TGF- β 1 induzierte Myofibroblastendifferenzierung kardialer Mausfibroblasten sind. Die Fähigkeit der Phänokonversion kardialer Fibroblasten zu Myofibroblasten trägt entscheidend zur Bedeutung dieses Zelltyps für die Entwicklung, Struktur und Funktion des Herzgewebes in physiologischen und pathologischen Zuständen bei [53].

Der Myokardinfarkt bzw. Ischämie/Reperfusionsschaden und die Herzinsuffizienz sind nach wie vor die führenden Ursachen für Morbidität und Mortalität in den westlichen Gesellschaften [2]. In Entwicklung und Verlauf dieser Krankheitsentitäten spielen kardiale Fibroblasten eine wichtige Rolle [131, 132]. Daher ist das bessere Verständnis kardialer Fibroblasten von herausragender Wichtigkeit.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- [1] Mortality, G.B.D. and C. Causes of Death, *Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015*. Lancet, 2016. 388(10053): p. 1459-1544.
- [2] Townsend, N., et al., *Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016*. Eur Heart J, 2016. 37(42): p. 3232-3245.
- [3] Zornoff, L.A., et al., *Ventricular remodeling after myocardial infarction: concepts and clinical implications*. Arq Bras Cardiol, 2009. 92(2): p. 150-64.
- [4] Gajarsa, J.J. and R.A. Kloner, *Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities*. Heart Fail Rev, 2011. 16(1): p. 13-21.
- [5] Burchfield, J.S., M. Xie, and J.A. Hill, *Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2*. Circulation, 2013. 128(4): p. 388-400.
- [6] Xie, M., J.S. Burchfield, and J.A. Hill, *Pathological ventricular remodeling: therapies: part 2 of 2*. Circulation, 2013. 128(9): p. 1021-30.
- [7] McDowell, K.S., et al., *Susceptibility to arrhythmia in the infarcted heart depends on myofibroblast density*. Biophys J, 2011. 101(6): p. 1307-15.
- [8] Jousset, F., et al., *Myofibroblasts Electrotonically Coupled to Cardiomyocytes Alter Conduction: Insights at the Cellular Level from a Detailed In silico Tissue Structure Model*. Front Physiol, 2016. 7: p. 496.
- [9] Sekaran, N.K., et al., *The Role for Cardiovascular Remodeling in Cardiovascular Outcomes*. Curr Atheroscler Rep, 2017. 19(5): p. 23.
- [10] Azevedo, P.S., et al., *Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment*. Arq Bras Cardiol, 2016. 106(1): p. 62-9.
- [11] Braunwald, E., *Heart failure*. JACC Heart Fail, 2013. 1(1): p. 1-20.
- [12] Heusch, G., et al., *Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure*. Lancet, 2014. 383(9932): p. 1933-43.
- [13] Tanai, E. and S. Frantz, *Pathophysiology of Heart Failure*. Compr Physiol, 2015. 6(1): p. 187-214.

- [14] Kong, P., P. Christia, and N.G. Frangogiannis, *The pathogenesis of cardiac fibrosis*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(4): p. 549-74.
- [15] Ambale-Venkatesh, B. and J.A. Lima, *Cardiac MRI: a central prognostic tool in myocardial fibrosis*. Nat Rev Cardiol, 2015. **12**(1): p. 18-29.
- [16] Liu, T., et al., *Current Understanding of the Pathophysiology of Myocardial Fibrosis and Its Quantitative Assessment in Heart Failure*. Front Physiol, 2017. **8**: p. 238.
- [17] Eltzschig, H.K. and T. Eckle, *Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1391-401.
- [18] Van de Werf, F., *The history of coronary reperfusion*. Eur Heart J, 2014. **35**(37): p. 2510-5.
- [19] Jennings, R.B., et al., *Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog*. Arch Pathol, 1960. **70**: p. 68-78.
- [20] Anttila, V., et al., *Review of remote ischemic preconditioning: from laboratory studies to clinical trials*. Scand Cardiovasc J, 2016. **50**(5-6): p. 355-361.
- [21] Zaugg, M. and E. Lucchinetti, *Remote Ischemic Preconditioning in Cardiac Surgery--Ineffective and Risky?* N Engl J Med, 2015. **373**(15): p. 1470-2.
- [22] Rai, V., et al., *Relevance of mouse models of cardiac fibrosis and hypertrophy in cardiac research*. Mol Cell Biochem, 2017. **424**(1-2): p. 123-145.
- [23] Tarnavski, O., et al., *Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies*. Physiol Genomics, 2004. **16**(3): p. 349-60.
- [24] Sack, M.N., et al., *Basic Biology of Oxidative Stress and the Cardiovascular System: Part 1 of a 3-Part Series*. J Am Coll Cardiol, 2017. **70**(2): p. 196-211.
- [25] Maejima, Y., et al., *Oxidative Stress and Cardiac Muscle Muscle 2-Volume Set*. 2012. 309-322.
- [26] Poyton, R.O., K.A. Ball, and P.R. Castello, *Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling*. Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(7): p. 332-40.
- [27] Cave, A.C., et al., *NADPH oxidases in cardiovascular health and disease*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(5-6): p. 691-728.

- [28] Schieber, M. and N.S. Chandel, *ROS function in redox signaling and oxidative stress*. Curr Biol, 2014. **24**(10): p. R453-62.
- [29] Shao, D., et al., *Redox modification of cell signaling in the cardiovascular system*. J Mol Cell Cardiol, 2012. **52**(3): p. 550-8.
- [30] Lukosz, M., et al., *Nuclear redox signaling*. Antioxid Redox Signal, 2010. **12**(6): p. 713-42.
- [31] Bedard, K. and K.H. Krause, *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 245-313.
- [32] Meier, B., et al., *Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts*. Biochem J, 1991. **275** (Pt 1): p. 241-5.
- [33] Cucoranu, I., et al., *NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts*. Circ Res, 2005. **97**(9): p. 900-7.
- [34] Sampson, N., P. Berger, and C. Zenzmaier, *Redox signaling as a therapeutic target to inhibit myofibroblast activation in degenerative fibrotic disease*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 131737.
- [35] Hagler, M.A., et al., *TGF-beta signalling and reactive oxygen species drive fibrosis and matrix remodelling in myxomatous mitral valves*. Cardiovasc Res, 2013. **99**(1): p. 175-84.
- [36] Barnes, J.L. and Y. Gorin, *Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases*. Kidney Int, 2011. **79**(9): p. 944-56.
- [37] Berndt, C., C.H. Lillig, and A. Holmgren, *Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(3): p. H1227-36.
- [38] Holmgren, A., *Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems*. Antioxid Redox Signal, 2000. **2**(4): p. 811-20.
- [39] Schallreuter, K.U. and J.M. Wood, *The role of thioredoxin reductase in the reduction of free radicals at the surface of the epidermis*. Biochem Biophys Res Commun, 1986. **136**(2): p. 630-7.
- [40] Watson, W.H., et al., *Redox potential of human thioredoxin 1 and identification of a second dithiol/disulfide motif*. J Biol Chem, 2003. **278**(35): p. 33408-15.

- [41] Hashemy, S.I. and A. Holmgren, *Regulation of the catalytic activity and structure of human thioredoxin 1 via oxidation and S-nitrosylation of cysteine residues*. J Biol Chem, 2008. **283**(32): p. 21890-8.
- [42] Barglow, K.T., et al., *Site-specific and redox-controlled S-nitrosation of thioredoxin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(35): p. E600-6.
- [43] Haendeler, J., et al., *Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(10): p. 743-9.
- [44] Tao, L., et al., *Nitrative inactivation of thioredoxin-1 and its role in postischemic myocardial apoptosis*. Circulation, 2006. **114**(13): p. 1395-402.
- [45] Zschauer, T.C., et al., *Interacting with thioredoxin-1--disease or no disease?* Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(9): p. 1053-62.
- [46] Saitoh, M., et al., *Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1*. EMBO J, 1998. **17**(9): p. 2596-606.
- [47] Haendeler, J., et al., *Cathepsin D and H2O2 stimulate degradation of thioredoxin-1: implication for endothelial cell apoptosis*. J Biol Chem, 2005. **280**(52): p. 42945-51.
- [48] Haendeler, J., et al., *Low doses of reactive oxygen species protect endothelial cells from apoptosis by increasing thioredoxin-1 expression*. FEBS Lett, 2004. **577**(3): p. 427-33.
- [49] Schroeder, P., et al., *Nuclear redox-signaling is essential for apoptosis inhibition in endothelial cells--important role for nuclear thioredoxin-1*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(11): p. 2325-31.
- [50] Zschauer, T.C., et al., *Oxidative stress-induced degradation of thioredoxin-1 and apoptosis is inhibited by thioredoxin-1-actin interaction in endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(3): p. 650-6.
- [51] Frangogiannis, N.G., L.H. Michael, and M.L. Entman, *Myofibroblasts in reperfused myocardial infarcts express the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb)*. Cardiovasc Res, 2000. **48**(1): p. 89-100.
- [52] Souders, C.A., S.L. Bowers, and T.A. Baudino, *Cardiac fibroblast: the renaissance cell*. Circ Res, 2009. **105**(12): p. 1164-76.
- [53] Camelliti, P., T.K. Borg, and P. Kohl, *Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts*. Cardiovasc Res, 2005. **65**(1): p. 40-51.

- [54] Kohl, P. and D. Noble, *Mechanosensitive connective tissue: potential influence on heart rhythm*. Cardiovasc Res, 1996. **32**(1): p. 62-8.
- [55] Yue, L., J. Xie, and S. Nattel, *Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation*. Cardiovasc Res, 2011. **89**(4): p. 744-53.
- [56] Nag, A.C., *Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution*. Cytobios, 1980. **28**(109): p. 41-61.
- [57] Frangogiannis, N.G., *Pathophysiology of Myocardial Infarction*. Compr Physiol, 2015. **5**(4): p. 1841-75.
- [58] Santiago, J.J., et al., *Cardiac fibroblast to myofibroblast differentiation in vivo and in vitro: expression of focal adhesion components in neonatal and adult rat ventricular myofibroblasts*. Dev Dyn, 2010. **239**(6): p. 1573-84.
- [59] MacKenna, D., S.R. Summerour, and F.J. Villarreal, *Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis*. Cardiovasc Res, 2000. **46**(2): p. 257-63.
- [60] Hinz, B. and G. Gabbiani, *Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts*. Curr Opin Biotechnol, 2003. **14**(5): p. 538-46.
- [61] Ng, C.P., B. Hinz, and M.A. Swartz, *Interstitial fluid flow induces myofibroblast differentiation and collagen alignment in vitro*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 20): p. 4731-9.
- [62] Swaney, J.S., et al., *Inhibition of cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis by activation and overexpression of adenylyl cyclase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(2): p. 437-42.
- [63] Lijnen, P. and V. Petrov, *Transforming growth factor-beta 1-induced collagen production in cultures of cardiac fibroblasts is the result of the appearance of myofibroblasts*. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2002. **24**(6): p. 333-44.
- [64] Biancheri, P., et al., *The role of transforming growth factor (TGF)-beta in modulating the immune response and fibrogenesis in the gut*. Cytokine Growth Factor Rev, 2014. **25**(1): p. 45-55.
- [65] Camelliti, P., et al., *Fibroblast network in rabbit sinoatrial node: structural and functional identification of homogeneous and heterogeneous cell coupling*. Circ Res, 2004. **94**(6): p. 828-35.

- [66] Ivey, M.J. and M.D. Tallquist, *Defining the Cardiac Fibroblast*. Circ J, 2016. **80**(11): p. 2269-2276.
- [67] Foo, I.T., et al., *Intracellular actin as a marker for myofibroblasts in vitro*. Lab Invest, 1992. **67**(6): p. 727-33.
- [68] Bonnans, C., J. Chou, and Z. Werb, *Remodelling the extracellular matrix in development and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(12): p. 786-801.
- [69] Spinale, F.G., *Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function*. Physiol Rev, 2007. **87**(4): p. 1285-342.
- [70] Shinde, A.V., C. Humeres, and N.G. Frangogiannis, *The role of alpha-smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling*. Biochim Biophys Acta, 2017. **1863**(1): p. 298-309.
- [71] Willems, I.E., et al., *The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars*. Am J Pathol, 1994. **145**(4): p. 868-75.
- [72] Nakaya, M., et al., *Cardiac myofibroblast engulfment of dead cells facilitates recovery after myocardial infarction*. J Clin Invest, 2017. **127**(1): p. 383-401.
- [73] Van Linthout, S., K. Miteva, and C. Tschöpe, *Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells*. Cardiovasc Res, 2014. **102**(2): p. 258-69.
- [74] Negmadjanov, U., et al., *TGF-beta1-mediated differentiation of fibroblasts is associated with increased mitochondrial content and cellular respiration*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0123046.
- [75] Ale-Agha, N., et al., *CDKN1B/p27 is localized in mitochondria and improves respiration-dependent processes in the cardiovascular system—New mode of action for caffeine*. PLoS Biol, 2018. **16**(6): p. e2004408.
- [76] Olovnikov, A.M., *[Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]*. Dokl Akad Nauk SSSR, 1971. **201**(6): p. 1496-9.
- [77] Olovnikov, A.M., *A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon*. J Theor Biol, 1973. **41**(1): p. 181-90.
- [78] Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider, *Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts*. Nature, 1990. **345**(6274): p. 458-60.
- [79] Greider, C.W. and E.H. Blackburn, *Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts*. Cell, 1985. **43**(2 Pt 1): p. 405-13.

- [80] Morin, G.B., *The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats.* Cell, 1989. **59**(3): p. 521-9.
- [81] Feng, J., et al., *The RNA component of human telomerase.* Science, 1995. **269**(5228): p. 1236-41.
- [82] Nakamura, T.M., et al., *Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human.* Science, 1997. **277**(5328): p. 955-9.
- [83] Malaquin, N., A. Martinez, and F. Rodier, *Keeping the senescence secretome under control: Molecular reins on the senescence-associated secretory phenotype.* Exp Gerontol, 2016. **82**: p. 39-49.
- [84] Collado, M., M.A. Blasco, and M. Serrano, *Cellular senescence in cancer and aging.* Cell, 2007. **130**(2): p. 223-33.
- [85] Bodnar, A.G., et al., *Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells.* Science, 1998. **279**(5349): p. 349-52.
- [86] Leri, A., et al., *Ablation of telomerase and telomere loss leads to cardiac dilatation and heart failure associated with p53 upregulation.* EMBO J, 2003. **22**(1): p. 131-9.
- [87] Oh, H., et al., *Telomerase reverse transcriptase promotes cardiac muscle cell proliferation, hypertrophy, and survival.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): p. 10308-13.
- [88] Bar, C., et al., *Telomerase expression confers cardioprotection in the adult mouse heart after acute myocardial infarction.* Nat Commun, 2014. **5**: p. 5863.
- [89] Geserick, C., et al., *Expression of mTert in primary murine cells links the growth-promoting effects of telomerase to transforming growth factor-beta signaling.* Oncogene, 2006. **25**(31): p. 4310-9.
- [90] Park, J.I., et al., *Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin.* Nature, 2009. **460**(7251): p. 66-72.
- [91] Smith, L.L., H.A. Collier, and J.M. Roberts, *Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation.* Nat Cell Biol, 2003. **5**(5): p. 474-9.
- [92] Hrdlickova, R., J. Nehyba, and H.R. Bose, Jr., *Alternatively spliced telomerase reverse transcriptase variants lacking telomerase activity stimulate cell proliferation.* Mol Cell Biol, 2012. **32**(21): p. 4283-96.

- [93] Werner, C., et al., *Effects of physical exercise on myocardial telomere-regulating proteins, survival pathways, and apoptosis*. J Am Coll Cardiol, 2008. 52(6): p. 470-82.
- [94] Werner, C., et al., *Physical exercise prevents cellular senescence in circulating leukocytes and in the vessel wall*. Circulation, 2009. 120(24): p. 2438-47.
- [95] Cong, Y. and J.W. Shay, *Actions of human telomerase beyond telomeres*. Cell Res, 2008. 18(7): p. 725-32.
- [96] Mason, P.J. and N. Perdignes, *Telomere biology and translational research*. Transl Res, 2013. 162(6): p. 333-42.
- [97] Ait-Aissa, K., et al., *Friend or foe? Telomerase as a pharmacological target in cancer and cardiovascular disease*. Pharmacol Res, 2016. 111: p. 422-433.
- [98] Zurek, M., et al., *Role of Telomerase in the Cardiovascular System*. Genes (Basel), 2016. 7(6).
- [99] Santos, J.H., J.N. Meyer, and B. Van Houten, *Mitochondrial localization of telomerase as a determinant for hydrogen peroxide-induced mitochondrial DNA damage and apoptosis*. Hum Mol Genet, 2006. 15(11): p. 1757-68.
- [100] Haendeler, J., et al., *Mitochondrial telomerase reverse transcriptase binds to and protects mitochondrial DNA and function from damage*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. 29(6): p. 929-35.
- [101] Maida, Y., et al., *An RNA-dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA*. Nature, 2009. 461(7261): p. 230-5.
- [102] Halliwell, B. and M. Whiteman, *Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?* Br J Pharmacol, 2004. 142(2): p. 231-55.
- [103] Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. 162(1): p. 156-9.
- [104] 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.
- [105] Ye, J., et al., *Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction*. BMC Bioinformatics, 2012. 13: p. 134.

- [106] Richter, K., et al., *Redox-fibrosis: Impact of TGFbeta1 on ROS generators, mediators and functional consequences*. Redox Biol, 2015. 6: p. 344-52.
- [107] Nistri, S., C. Sassoli, and D. Bani, *Notch Signaling in Ischemic Damage and Fibrosis: Evidence and Clues from the Heart*. Front Pharmacol, 2017. 8: p. 187.
- [108] Harley, C.B., et al., *A natural product telomerase activator as part of a health maintenance program*. Rejuvenation Res, 2011. 14(1): p. 45-56.
- [109] Tarbit, E., et al., *Biomarkers for the identification of cardiac fibroblast and myofibroblast cells*. Heart Fail Rev, 2018.
- [110] Wang, J., et al., *Mechanical force regulation of myofibroblast differentiation in cardiac fibroblasts*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. 285(5): p. H1871-81.
- [111] Yeung, T., et al., *Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion*. Cell Motil Cytoskeleton, 2005. 60(1): p. 24-34.
- [112] Kloxin, A.M., J.A. Benton, and K.S. Anseth, *In situ elasticity modulation with dynamic substrates to direct cell phenotype*. Biomaterials, 2010. 31(1): p. 1-8.
- [113] Driesen, R.B., et al., *Reversible and irreversible differentiation of cardiac fibroblasts*. Cardiovasc Res, 2014. 101(3): p. 411-22.
- [114] Herum, K.M., et al., *Mechanical regulation of cardiac fibroblast profibrotic phenotypes*. Mol Biol Cell, 2017. 28(14): p. 1871-1882.
- [115] Zhou, Y., A.M. Richards, and P. Wang, *Characterization and Standardization of Cultured Cardiac Fibroblasts for Ex Vivo Models of Heart Fibrosis and Heart Ischemia*. Tissue Eng Part C Methods, 2017. 23(7): p. 422-433.
- [116] Chan, E.C., et al., *Nox4 modulates collagen production stimulated by transforming growth factor beta1 in vivo and in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. 430(3): p. 918-25.
- [117] Barcellos-Hoff, M.H. and T.A. Dix, *Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1*. Mol Endocrinol, 1996. 10(9): p. 1077-83.
- [118] Ahmed, S., et al., *Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress*. J Cell Sci, 2008. 121(Pt 7): p. 1046-53.

- [119] Dyballa-Rukes, N., et al., *The Anti-Apoptotic Properties of APEX1 in the Endothelium Require the First 20 Amino Acids and Converge on Thioredoxin-1*. Antioxid Redox Signal, 2017. 26(12): p. 616-629.
- [120] Tallquist, M.D. and J.D. Molkenin, *Redefining the identity of cardiac fibroblasts*. Nat Rev Cardiol, 2017. 14(8): p. 484-491.
- [121] Stawowy, P., et al., *Regulation of matrix metalloproteinase MT1-MMP/MMP-2 in cardiac fibroblasts by TGF-beta1 involves furin-convertase*. Cardiovasc Res, 2004. 63(1): p. 87-97.
- [122] Nemir, M., et al., *The Notch pathway controls fibrotic and regenerative repair in the adult heart*. Eur Heart J, 2014. 35(32): p. 2174-85.
- [123] Phatharajaree, W., A. Phrommintikul, and N. Chattipakorn, *Matrix metalloproteinases and myocardial infarction*. Can J Cardiol, 2007. 23(9): p. 727-33.
- [124] Lindsey, M.L. and R. Zamilpa, *Temporal and spatial expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases following myocardial infarction*. Cardiovasc Ther, 2012. 30(1): p. 31-41.
- [125] Imai, K., et al., *Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release*. Biochem J, 1997. 322 (Pt 3): p. 809-14.
- [126] Siwik, D.A., P.J. Pagano, and W.S. Colucci, *Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. 280(1): p. C53-60.
- [127] Hayashidani, S., et al., *Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. 285(3): p. H1229-35.
- [128] Liu, T., et al., *Telomerase activity is required for bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice*. J Clin Invest, 2007. 117(12): p. 3800-9.
- [129] Indran, I.R., M.P. Hande, and S. Pervaiz, *hTERT overexpression alleviates intracellular ROS production, improves mitochondrial function, and inhibits ROS-mediated apoptosis in cancer cells*. Cancer Res, 2011. 71(1): p. 266-76.
- [130] Singhapol, C., et al., *Mitochondrial telomerase protects cancer cells from nuclear DNA damage and apoptosis*. PLoS One, 2013. 8(1): p. e52989.

- [131] Porter, K.E. and N.A. Turner, *Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling*. Pharmacol Ther, 2009. 123(2): p. 255-78.
- [132] Dostal, D., S. Glaser, and T.A. Baudino, *Cardiac fibroblast physiology and pathology*. Compr Physiol, 2015. 5(2): p. 887-909.

6 Danksagungen

Hiermit bedanke ich mich bei allen, die mich bei der Dissertation unterstützt haben.

Zu allererst bei Frau Prof. Dr. Jojo Haendeler und PD Dr. Yogi Altschmied für die Möglichkeit dieses spannende Thema untersuchen zu dürfen und die außerordentlich gute Betreuung.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Axel Gödecke für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe (Nilo, Fee, Sascha, Anna, Philipp, Florian, Nadine, Steffi, Olaf, Tim, Sabrina, Kirsten, Karin) bedanke ich mich sowohl für die Hilfe und Unterstützung im Labor als auch den Spaß an der Arbeit während der gesamten Promotionszeit.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie für all die Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg.